

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Optimisation de l'utilisation des techniques de modélisation dans le passage de l'étape pré-clinique à clinique du développement d'un médicament

Par
Julie Grenier

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Septembre 2008

© Julie Grenier, 2008

Faculté de pharmacie
Université de Montréal
Grade octroyé le:

2009-07-09

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Optimisation de l'utilisation des techniques de modélisation dans le passage de l'étape pré-clinique à clinique du développement d'un médicament

Présentée par :

Julie Grenier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

France Varin
Président-rapporteur

Murray P. Ducharme
Directeur de recherche

Jacques Turgeon
Codirecteur

Fahima Nekka
Membre du jury

Nils Hoem
Examineur externe

Jacques Bélair
Représentant du doyen de la FES

Résumé

Le sujet de cette thèse porte sur l'optimisation de l'utilisation de la modélisation dans le cadre du développement d'un médicament. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à différentes techniques de modélisation par une approche de pharmacocinétique de population. Toutes ne font pas les mêmes hypothèses et les mêmes approximations et ne sont donc pas optimales dans tous les contextes. Il est donc important de connaître quelles sont les hypothèses et les limitations des outils utilisés afin d'en maximiser l'utilisation selon le type de données à analyser. Notre étude comparative est utile en ce sens. Plusieurs méthodologies ont été comparées dans la littérature mais sur un nombre très limité de modèles structuraux.

Nous avons donc évalué la performance de différentes méthodes à l'aide d'une série de 46 études simulées. Le nombre d'individus, le type d'administration, le type d'échantillonnage, la matrice d'échantillonnage, le nombre de compartiments dans le modèle structural et le type de distribution statistique des paramètres variaient d'une étude à l'autre. Les méthodes testées étaient les analyses standard en deux étapes (STS) et globale en deux étapes (GTS) à l'aide du programme ADAPT II® Version IV; trois approches utilisant la modélisation avec effets combinés avec les programmes IT2S®, NONMEM® version V (NMV) et le module de population de Kinetica™ version 4.2. Nous avons évalué la performance et la capacité de ces méthodes à estimer la vraie moyenne de population des paramètres pharmacocinétique (PK), leur variance, la variabilité résiduelle ainsi que les paramètres PK individuels. Comme on pouvait s'y attendre, le type d'échantillonnage, i.e. riche ou épars, est un facteur qui influençait grandement la précision des estimés. Avec les modèles structuraux inclus dans notre étude, NONMEM® apparaît de façon générale comme la méthode de choix. Par contre, IT2S® reprenait un certain avantage lorsque le nombre de compartiments augmentait dans le modèle structural.

Nous avons dans un deuxième temps évalué la pertinence de construire un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK). Bien que ce genre de modèle soit relativement difficile à élaborer, il offre l'avantage théorique d'intégrer autant des données *in vitro* que *in vivo* chez l'animal. Nous avons comparé ce type de modélisation à la méthode plus classique de

l'allométrie avec la cyclosporine comme médicament modèle. La clairance systémique de la cyclosporine était grandement surestimée par l'allométrie classique mais la règle des exposants améliorait la prédiction. Dans le cas particulier de la cyclosporine, c'est une méthode d'extrapolation *in vitro-in vivo* qui tient compte de la variabilité dans la distribution des enzymes CYP qui a donné la meilleure prédiction trouvée dans la littérature. Pour le volume total de distribution, l'allométrie surestime grandement les valeurs observées pour la cyclosporine et des approches plus physiologiques ont donné de meilleurs résultats. L'allométrie a une très faible capacité à prédire la biodisponibilité et les modèles physiologiques d'absorption sont très difficiles à établir. Nous avons néanmoins tenté d'en construire un pour la cyclosporine et sommes quand même parvenus à une prédiction acceptable de la biodisponibilité. Par une analyse de sensibilité du modèle aux valeurs des paramètres, nous avons vu que le modèle d'absorption est très sensible aux valeurs de plusieurs paramètres et que leur estimation est somme toute assez difficile. Enfin, nous avons vu que la variabilité de certains paramètres physiologiques entre des individus est un aspect que néglige l'allométrie mais qui peut très bien s'intégrer dans la modélisation physiologique. Nous avons utilisé un modèle PBPK qui s'est avéré plus performant que l'allométrie dans la prédiction de la pharmacocinétique de la cyclosporine. L'allométrie demeure par contre beaucoup plus simple conceptuellement et plus rapide, mais nécessite une plus grande utilisation d'animaux et connaît également des limitations dans ses prédictions.

Afin d'obtenir des données PK de cyclosporine chez l'humain pour valider le modèle PBPK, une étude sur l'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberges a été réalisée. Le pomelo augmente les concentrations de cyclosporine lorsqu'il est administré avec celle-ci. Cette augmentation est cliniquement significative mais elle est atténuée comparativement aux effets observés avec le pamplemousse, suivant une dose unique de cyclosporine. Nos données semblent également suggérer que l'effet du pomelo soit le résultat d'une inhibition des enzymes CYP3A et P-gp au niveau de l'intestin plutôt qu'au niveau du foie. Par contre, pour ce qui est du jus de canneberge, son administration avec la cyclosporine ne produit aucun effet significatif sur les concentrations sanguines de cyclosporine.

Mots clés :

Pharmacocinétique, population, physiologique, cyclosporine, allométrie, absorption intestinale, P-gp, CYP3A.

Abstract

This thesis is about the optimization of pharmacokinetic (PK) modeling in the drug development context. Different population modeling techniques were first compared. It is important to know the theoretical background behind those techniques and their limitations. Numerous modeling methods exist but none of them are universal. It is therefore advisable to learn in which context they should be used. The comparative study performed is useful in that sense. Some comparative studies are found in the literature but all of them were performed on very limited types of structural models.

We therefore evaluated the performance of different methods using 46 simulated studies varying in the number of individuals, type of administration, type of sampling, type of sample matrix, number of compartments in the structural model as well as the statistical distribution of the pharmacokinetic parameters. The tested methods were the Standard-2-Stage (STS) and Global-2-Stage (GTS) using ADAPT II® Version IV; three mixed-effect modeling approaches using Iterative-2-Stage (IT2S®), NONMEM® version V (NMV) and the population module of Kinetica™ version 4.2. The performance and the capacity of these methods were evaluated for their ability to estimate the true population mean of the pharmacokinetic parameters, the population variance estimates, the residual variability and the individual estimates of the PK parameters. As expected, the type of sampling, i.e. rich or sparse, is of great importance in the precision of the estimates. With the structural models included in our study, NONMEM® generally appears as the best method. However, IT2S® seemed to gain some advantages when the number of compartments increased in the structural model.

The second part of this thesis is about the relevance of constructing a physiological pharmacokinetic model (PBPK). This type of model is very complicated to develop but has the theoretical advantage of integrating *in vitro* and animal *in vivo* data. This type of model was compared against a more conventional method, allometry, using cyclosporine as drug model. The systemic clearance of cyclosporine was greatly overestimated by classical allometry but the prediction was better using the rule of exponent. In the particular case of cyclosporine, the best prediction found in the literature was achieved by an *in vitro-in vivo* method that takes into

account the variability in the distribution of CYP enzymes. For the volume of distribution, allometry also greatly overestimates the observed values for cyclosporine while more physiological approaches gave better results. Allometry shows very poor prediction capacity for bioavailability but physiological modeling of intestinal absorption is very difficult to establish. Nevertheless, we attempted the construction of such a model for cyclosporine and achieved a prediction of its bioavailability within two fold of observed values. A sensitivity analysis of the model shows that it is extremely sensitive to some of the model parameters, both physiological as well as pharmacokinetic, which in addition are often difficult to estimate. Finally, the variability between individuals can not be handled by allometry but that can be integrated in a physiological model. The PBPK model used gave better predictions of cyclosporine pharmacokinetics than allometry. However, allometry is conceptually much simpler and easier to use, it is faster but requires the use of more animals.

In order to obtain cyclosporine PK data in humans to validate the PBPK model, a drug interaction study was performed with pomelo and cranberry juices. Like for grapefruit, the co-administration of pomelo increases the cyclosporine blood concentrations. Although the effect seen is less important than the one seen with grapefruit juice, it is nonetheless clinically significant following a single dose of cyclosporine with one glass of pomelo juice. The data also suggests that the increase in cyclosporine blood concentrations due to pomelo is the result of an inhibition of CYP3A and P-gp enzymes in the small intestine rather than in the liver. The co-administration of cranberry juice with cyclosporine following a single dose did not produce any significant effect on cyclosporine blood concentrations.

Key words :

Pharmacokinetic, population, physiological, cyclosporine, allometry, intestinal absorption, P-gp, CYP3A.

Table des matières

Chapitre 1 – Introduction	1
1.1 Coût du développement d'un médicament	1
1.2 Processus de développement d'un médicament	3
1.3 Sujet de la thèse	7
1.4 Références	8
 Chapitre 2 - Recension de la littérature	10
2.1 Analyse pharmacocinétique	10
2.1.1 Analyse noncompartimentale	11
2.1.2 Analyse compartimentale	12
2.1.3 Les estimateurs	20
2.1.4 Analyse compartimentale de population	22
2.2 Développement du médicament : passage de l'étape pré-clinique à clinique	26
2.2.1 Extrapolation à l'humain à partir de la détermination du NOAEL	26
2.2.2 Allométrie	28
2.2.3 Extrapolation à l'échelle humaine de données <i>in vitro</i>	30
2.2.4 Modélisation à base physiologique	33
2.3 Cyclosporine et interactions médicamenteuses	41
2.3.1 Cyclosporine	41
2.3.2 Cytochrome P450	44
2.3.3 P-glycoprotéine	47
2.3.4 Interactions avec les médicaments : métabolisme et transport	49
2.3.4.1 Mécanismes d'inhibition réversible	50
2.3.4.2 Mécanismes d'inhibition irréversible	51
2.3.4.3 Interactions au niveau des transporteurs	52
2.4 Références	54
 Chapitre 3 – Méthodologie	70
3.1 Étude comparative entre différentes méthodes d'analyses compartimentales individuelle et de population	70
3.1.1 Simulation des données	70
3.1.2 Standard-Two-Stage (STS) et Global-Two-Stage (GTS)	71
3.1.3 Méthode itérative en 2 étapes (IT2S : Iterative-Two-Stage)	72
3.1.4 NONMEM®	74
3.1.5 Kinetica™	74

3.2	Passage de l'étape pré clinique à clinique : comparaison entre l'allométrie et la modélisation à base physiologique	75
3.3	Cyclosporine et interactions médicamenteuses	77
3.4	Références	78

Chapitre 4 - Pomelo juice but not cranberry juice affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans

4.1	Préambule à l'étude d'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberges	82
4.2	Abstract	85
4.3	Introduction	86
4.4	Methods	87
4.4.1	Subjects	87
4.4.2	Study design	87
4.4.3	Determination of cyclosporine blood concentrations	88
4.4.4	Pharmacokinetic calculations	89
4.4.5	Statistical analysis	89
4.5	Results	90
4.6	Discussion	91
4.7	Conclusion	94
4.8	References	95

Chapitre 5 - The Prediction of the Pharmacokinetics of Cyclosporine in Humans: is a Physiological Modeling Approach Worth the Trouble vs Allometry

5.1	Préambule à la modélisation physiologique de la pharmacocinétique de la cyclosporine et comparaison avec l'allométrie	104
5.2	Abstract	109
5.3	Introduction	111
5.4	Methodology	112
5.4.1	Allometric scaling	112
5.4.2	PBPK modeling: extrahepatic metabolism	113
5.4.2.1	Initial model – without extrahepatic metabolism	113
5.4.2.2	Extrahepatic metabolism for IV administration	115
5.4.3	PBPK modeling: absorption model	116
5.4.3.1	Fraction absorbed consideration	116
5.4.3.2	Segregated blood flow model for intestinal perfusion	117
5.4.3.3	Transport in Caco-2 cells modeling	118

5.4.3.4	Transport in intestinal tissue – Scale-up from Caco-2 cells system	119
5.4.3.5	Segmentation of the intestine	120
5.4.3.6	Rationale for the intrinsic hepatic clearance values used	121
5.4.3.7	Intestinal intrinsic clearance determination for the oral absorption model	122
5.4.4	Noncompartmental analysis	123
5.5	Results	124
5.5.1	Allometric scaling	124
5.5.2	PBPK modeling	124
5.5.2.1	Addition of an extrahepatic metabolism term for IV administration	124
5.5.2.2	Caco-2 modeling	125
5.5.2.3	Simulation with initial estimates	125
5.5.2.4	Sensitivity of the model to different parameter values	125
5.6	Discussion	127
5.7	Conclusion	132
5.8	References	134
Chapitre 6 - Comparison of Different Population Pharmacokinetic Methods		164
6.1	Préambule à l'étude comparative de différentes méthodes d'analyse pharmacocinétique compartimentale de population	169
6.2	Abstract	169
6.3	Introduction	170
6.4	Methodology	171
6.4.1	Simulation of the studies	171
6.4.2	Tested methods	172
6.4.2.1	STS and GTS	173
6.4.2.2	IT2S®	173
6.4.2.3	NONMEM®	174
6.4.2.4	Kinetica™	174
6.4.3	Performance criteria	175
6.5	Results	176
6.5.1	Population mean estimates	176
6.5.2	Individual estimates	176
6.5.3	Population variance and residual variability estimates	176
6.5.4	Relative performance of methods compared to the best ones	177
6.5.5	Comparison of NONMEM® and IT2S®	178
6.6	Discussion	179

6.7	Conclusion	183
6.8	References	185
Chapitre 7 - Discussion générale et conclusion		196
7.1	Interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberge	196
7.2	Allométrie vs modélisation PBPK et modèle d'absorption PBPK	199
7.3	Analyses compartimentales individuelle et de population	202
7.4	Conclusion	204
7.5	Références	206

Liste des tableaux

Chapitre 4 – Pomelo juice but not cranberry juice affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans

Table 1: Single-dose pharmacokinetics of cyclosporine administered with water, pomelo juice and cranberry juice in 12 healthy volunteers.	99
Table 2: Statistical comparison of selected pharmacokinetic parameters of cyclosporine between pomelo juice and cranberry juice treatments vs. water.	100

Chapitre 5 - The prediction of the pharmacokinetics of cyclosporine in humans: is a physiological modeling approach worth the trouble vs allometry

Table 1 - Comparaison des valeurs simulées et expérimentales d'AUC _t (0-32h) pour une Dose de 5.9 mg/kg de cyclosporine donnée en infusion de 2 minutes chez un rat de 250 g	105
Table 2 – Values used for allometric scaling for body weight (BW), shape factor (k), body surface area (BSA), brain weight (BrW) and maximum lifespan potential (MLP).	143
Table 3 – Predicted systemic CL and V _{ss} of cyclosporine from allometric scaling for a 70 kg human adult. Equation 1 is for the simple allometry, 2 is for MLP correction, 3 is for BrW correction and 4 is for using BSA instead of BW.	144
Table 4: Comparison of the simulated and observed pharmacokinetics of blood cyclosporine using the original model of Kawai and Rowland (E _{gut} =0) and the modified model with gut metabolism (E _{gut} =0.05).	145
Table 5 - Active and passive transport parameter values obtained from compartmental analysis of Caco-2 cells permeability experiments.	146
Table 6: Comparison of the noncompartmental parameters for experimental and simulated data for a 200 mg oral dose of cyclosporine to a 70kg human adult using the absorption model with the initial estimates. Experimental values are from 12 healthy volunteers who received a 200 mg dose of cyclosporine with water.	147
Table 7: Descriptive statistics on the noncompartmental parameters from the population simulation of 50 individuals receiving a 200 mg oral dose of cyclosporine for a mean Q _{trs} of 1015 mL/h with a CV of 36%, assuming a normal distribution.	148

Chapitre 6 – Comparison of different population pharmacokinetic methods

Table 1 - Summary of the different simulated studies	189
Table 2 - Precision of estimates	190

Liste des figures

Chapitre 2 – Recension de la littérature

Figure 1: Représentation schématique d'un modèle à 1 compartiment suivant une administration orale d'un médicament.	16
Figure 2: Représentation schématique d'un modèle à 2 compartiments suivant une administration orale d'un médicament	17
Figure 3 : Représentation schématique d'un modèle PBPK global.	35
Figure 4: Schéma et équations décrivant une distribution tissulaire limitée par la perfusion ou la perméabilité.	37
Figure 5: Structure chimique de la cyclosporine	43
Figure 6 : Schéma général du cycle catalytique du P450	47
Figure 7 : Localisation dans les tissus et rôle des protéines de transport dans la disposition des médicaments	49

Chapitre 3 – Méthodologie

Figure 1: Schéma du modèle de distribution de la cyclosporine dans les tissus.	76
---	----

Chapitre 4 – Pomelo juice but not cranberry juice affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans

Figure 1 : Profils des concentrations sanguines de cyclosporine (CsA) chez 12 volontaires sains suivant une dose orale de 200 mg de Neoral® administré avec de l'eau	83
Figure 2: Cyclosporine mean blood concentrations in humans following a 200 mg dose of Neoral® 100 mg soft gelatin capsules, given with water, pomelo juice or cranberry juice in healthy volunteers. Error bars are indicating the standard deviation.	101

Chapitre 5 - The prediction of the pharmacokinetics of cyclosporine in humans: is a physiological modeling approach worth the trouble vs allometry

Figure 1: Simulation des profils de concentrations sanguines de cyclosporine (CsA) suite à une administration intraveineuse d'une dose de 175 mg, infusée sur 3h chez un adulte de 70 kg selon quatre modèles de distribution tissulaire physiologiques. Perm = limité par la perméabilité tissulaire; BF = limité par la perfusion des tissus; Kp = constante de partage

..... 107

Figure 2: Compartment model for the active and passive transport of cyclosporine across Caco-2 cells. Jefflux represents the active transport from Caco-2 cells to the apical side; Jbas and Jap are the flux associated to passive diffusion and for which the direction is determined by the concentration gradient.149

Figure 3 Schematic representation of the absorption from the gut lumen. Jefflux is the flux associated to active transport by P-gp; Jap and Jbas are the flux associated to passive diffusion on the apical and basal side of the enterocytes, respectively; Qtrs is the small intestinal transit expressed as a flow; Qgut is the blood flow perfusing the gut; fent is the fraction of Qgut perfusing the enterocyte layer; CLgut is the metabolic clearance in the enterocytes. 150

Figure 4: Simulation for a dose of 4 mg/kg given as an IV infusion over 2.5h to a 70kg adult with and without extrahepatic metabolism. The percentage for Egut represents the % of total observed clearance. The experimental values are approximations of data from the literature [34].151

Figure 5: Simulation for a dose of 2.5 mg/kg given as an IV infusion over 3h to a 70kg adult with and without extrahepatic metabolism. The percentage for Egut represents the % of total observed clearance. The experimental values are approximations of data from the literature [35].152

Figure 6: Simulation for a 200 mg oral dose of cyclosporine to a 70kg human adult using the absorption model with the initial estimates. Experimental values are from 12 healthy volunteers who received a 200 mg dose of cyclosporine with water (previously published [65]).153

Figure 7: Effect of CLint,H and CLint,G on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose. The x axis represents the CLint,H values and the corresponding CLint,G is 0.83% of the CLint,H, as described in the methodology section.154

Figure 8: Effect of CLint,G on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose. The CLint,H is fixed.155

Figure 9: Effect of Jmax on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose.156

Figure 10: Effect of fent on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose	157
Figure 11: Effect of Sabs on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose	158
Figure 12: Effect of Qtrs on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose	159
Figure 13: Population simulation of 50 individuals receiving a 200 mg oral dose of cyclosporine for a mean Qtrs of 1015 mL/h with a CV of 36%, assuming a normal distribution.	160

Chapitre 6 – Comparison of different population pharmacokinetic methods

Figure 1 – Median % bias on variability estimates for each method	191
Figure 2 – Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods: rich vs sparse sampling	192
Figure 3 – Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods by type of sampling and number of subjects	193
Figure 4 – Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods: normal vs log-normal distribution	194
Figure 5 – Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods by number of compartements	195

Liste des abréviations et symboles

a	Coefficient allométrique
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
AIC	Critère d'Akaike
ANOVA	Analyse de variance
AUCinf	Surface sous la courbe du temps 0 jusqu'à un temps infini
AUCt	Surface sous la courbe du temps 0 jusqu'à la dernière concentration mesurable
AUMC	Surface sous les moments de la courbe
b	Exposant allométrique
BSA	Surface corporelle
BrW	Masse du cerveau
BW	Masse corporelle
C	Concentration
CL	Clairance
CLd	Clairance de distribution
C _{last}	Dernière concentration mesurable
CLint	Clairance intrinsèque
CL _{int,G}	Clairance intrinsèque de l'intestin
CL _{int,H}	Clairance intrinsèque du foie
CL _s	Clairance systémique
C _{max}	Concentration maximale
CV	Coefficient de variation
CYP	Cytochrome P450
E _G	Coefficient d'extraction de l'intestin
EM	Algorithme EM (expectation-maximisation)
F	Biodisponibilité
F _A	Fraction de la dose absorbée au niveau de l'intestin
F _G	Fraction de la dose absorbée qui n'est pas métabolisée par l'intestin
F _H	Fraction de la dose qui atteint la veine porte et qui n'est pas métabolisée au premier passage dans le foie
f _{bc}	Fraction volumique des hématocrites dans le sang
f _{plasma}	Fraction volumique du plasma dans le sang
FDA	Food and Drug Administration
FO	Méthode d'estimation de premier ordre
FOCE	Méthode d'estimation de premier ordre conditionnelle

f_{u_i}	Fraction libre de médicament dans le fluide interstitiel de l'intestin
f_{u_p}	Fraction libre de médicament dans le plasma
f_{u_T}	Fraction libre de médicament dans les tissus
$f_{v_{gut}}$	Fraction volumique de l'espace vasculaire de l'intestin
GLM	Modèle général linéaire
GLS	Generalized least squares (moindres carrés généralisés)
GTS	Global-Two-Stage
h	Heure
IT2S	Iterative-Two-Stage
IV	Administration par voie intraveineuse
J_{ap}	Flux de médicament à travers la membrane apicale des entérocytes associé à la diffusion passive
J_{bas}	Flux de médicament à travers la membrane basale des entérocytes associé à la diffusion passive
J_{diff}	Flux de médicament à travers les entérocytes associé à la diffusion passive
J_{efflux}	Flux de médicament à travers la membrane apicale des entérocytes associé au transport actif par la P-gp
J_{max}	J_{efflux} maximum
k	Facteur associé à la forme de l'animal en allométrie
k_a	Constance d'absorption de premier ordre
k_{ass}	Constante d'association de premier ordre du médicament dans les tissus
k_{dis}	Constante de dissociation de premier ordre du médicament dans les tissus
$K_{D,bc}$	Constante de dissociation dans les érythrocytes
k_{el}	Constante d'élimination de premier ordre apparente
k_{in}	Interrupteur mathématique activant et désactivant le compartiment de l'estomac après qu'une dose orale d'un médicament se soit complètement transférée dans le petit intestin.
k_m	Concentration de médicament nécessaire pour être à la moitié du J_{max}
L	Litre
LC/MS/MS	Chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem
LD	Modèle linéaire de distribution tissulaire de la cyclosporine dans les tissus
logN	Distribution log-normale
LSM	Moyennes des moindres carrés (least square means)
M	Masse corporelle
MAP	Maximum <i>a posteriori</i> probability (probabilité maximale <i>a posteriori</i>)
m _{cg}	Microgramme
mg	Milligramme
ML	Maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood)

MLP	Potentiel d'espérance de vie maximale (Maximum life span potential)
MRT	Temps de residence moyen
N	Distribution normale
NMV	Logiciel NONMEM® version 5
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (niveau sans effet indésirable observé)
nP_T	Nombre de sites de liaison dans les érythrocytes
OLS	Ordinary Least Squares (moindre carrés standard)
P	Paramètre à extrapoler par allométrie
PBPK	Pharmacocinétique à base physiologique
PD	Pharmacodynamie
P-gp	P-glycoprotéine
PhRMA	Pharmaceutical Research and Manufacturers of America
PK	Pharmacocinétique
PO	Administration par voie orale
PS_{bc}	Coefficient de perméabilité entre les érythrocytes et le plasma
PS_{tc}	Coefficient de perméabilité entre le fluide interstitiel et les tissus
Q	Flux sanguin à un organe
Q_{gut}	Flux sanguin allant aux intestines
Q_H	Flux sanguin hépatique total (artère + veine porte)
Q_{trs}	Vitesse de transit dans le petit intestin exprimée en flux en mL/h
S_{abs}	Surface d'absorption efficace dans le petit intestin (par segment)
SD	Déviatiion standard
SS	Somme des moindres carrés des résidus
STS	Standard-Two-Stage
$t_{1/2}$	Demie-vie d'élimination apparente de premier ordre
t_{lag}	Temps de latence
t_{max}	Temps de la concentration maximale
Var	Variance
Vc	Volume du compartiment central
V_{gut}	Volume du tissu intestinale
V_{lumen}	Volume interne de la lumière du petit intestin
Vp	Volume du compartiment périphérique
V_{ss}	Volume de distribution total apparent
WLS	Weighted Least Squares (moindre carrés avec poids)

Remerciements

D'abord à toi Yvan sans qui je n'aurais jamais osé me lancer dans cette folle aventure et sans qui je ne m'en serais pas sortie non plus. Même si tu as parfois douté que ceci aurait une fin, tu n'as jamais cessé de m'épauler et je t'en suis reconnaissante.

À mes enfants, Émile et Mathieu. Vous êtes encore trop jeunes n'ayant même pas commencé l'école pour comprendre ce que vient de faire votre maman mais c'est en partie en pensant à vous que j'ai fait tout ça. Pour vous donner un exemple de persévérance et pour que vous soyez peut-être un jour fiers de moi... une fois passé votre adolescence!

À mes parents, Anne-Marie et Jean-Jacques, qui ont toujours répondu à l'appel pour garder la marmaille quand le besoin s'en faisait ressentir et qui m'encourage toujours dans tout ce que j'entreprends dans la vie.

A Jean Lavigne pour avoir si généreusement partagé son savoir de mathématicien-informaticien-pharmacocinéticien. Merci pour tout ce temps passé à répondre à mes très (trop?) nombreuses questions. Et il y en a eu !

À Véronique, Josée et Diane pour leur cerveau de statisticiennes (même si vous croyez que les stats bayésiennes sont ésotériques).

A Murray Ducharme mon directeur et Jacques Turgeon mon co-directeur pour tous leurs bons conseils.

Finalement à tous mes amis qui ont cru que j'avais perdu quelques boulons, merci de m'avoir quand même encouragée !

Chapitre 1

Introduction

Dans un contexte où un composé entrant en Phase 1 de développement n'a que 8% des chances de se retrouver sur le marché et où l'investissement requis en recherche et développement pour mettre un médicament sur le marché a augmenté de plus de 50% depuis le début des années 2000 par rapport à la période 1995-2000, il est impératif pour l'industrie pharmaceutique d'optimiser sa façon de faire. C'est dans cette optique que la Food and Drug Administration (FDA) a mis sur pied un groupe de travail (Critical Path Initiative) dont l'objectif est de trouver des façons d'améliorer le processus de développement des médicaments. La première étape franchie fût d'identifier et de prioriser les problèmes majeurs ainsi que les domaines les plus susceptibles d'aider à un développement plus efficace [1].

1.1 Coût du développement d'un médicament

D'après la PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America), il en coûtait en moyenne entre 500 et 800 millions \$US en 2001 pour amener un médicament sur le marché à partir du moment où la molécule est identifiée comme ayant un potentiel thérapeutique et les coûts ne cessent d'augmenter d'après les estimations pour l'année 2005 [2, 3]. Ce chiffre inclut cependant non seulement les coûts inhérents d'un développement fructueux mais également le coût de tous les projets de recherche infructueux reliés à cette molécule, i.e. les molécules similaires qui n'ont pu se retrouver sur le marché. On y inclut également le coût du capital lui-même, i.e. que si l'argent n'avait pas été investi dans ce projet, elle aurait pu l'être ailleurs et rapporter le rendement minimum demandé par les bailleurs de fonds de l'entreprise (créanciers et actionnaires). Si on exclut ce dernier facteur, le coût réel pour une seule molécule est plutôt de l'ordre de 125-250 million \$US (toujours selon les chiffres de 2001) [4]. Aux Etats-Unis, au Canada et dans la communauté européenne en général, une compagnie pharmaceutique dispose au minimum d'un brevet de 20 ans sur une molécule, période durant laquelle elle devra

passer au travers des étapes pré-cliniques et cliniques du développement et de la mise en marché. On rapporte que le développement d'un seul médicament nécessite en moyenne de 10 à 15 ans de recherche et de développement, ce qui ne laisse donc en moyenne que cinq à dix ans d'exclusivité pour la compagnie innovatrice [2, 4, 5]. Une fois le brevet expiré, les compagnies génériques peuvent à leur tour commercialiser le médicament et les ventes du produit innovateur chutent souvent de moitié dans l'année qui suit l'expiration du brevet [3]. Sur 5000 à 10 000 molécules testées initialement à l'étape de la découverte pour une cible thérapeutique définie, environ 250 passeront à l'étape pré-clinique, 5 seront testées en Phase I chez l'humain et une seule sera acceptée par les agences réglementaires pour se retrouver sur le marché. De plus, mentionnons que 10-15% des médicaments soumis pour approbation à la FDA ne rencontrent pas les critères d'efficacité ou d'innocuité [2]. Par conséquent, les compagnies pharmaceutiques innovatrices mettent beaucoup d'effort pour développer des méthodes plus efficaces à toutes les étapes de développement d'un médicament. Cela va du tout début de la phase de sélection d'une molécule où l'on tente d'optimiser les techniques de synthèse en chimie combinatoire. Cette technique consiste à synthétiser de façon simultanée un ensemble de molécules à partir de quelques blocs moléculaires de départ et ainsi obtenir une banque de molécules à partir de laquelle on amorce le processus de sélection [6]. La chimie combinatoire serait peu utile si elle n'était pas combinée à des méthodes efficaces de sélection. La sélection se fait surtout par des tests *in vitro* permettant par exemple d'évaluer l'activité *in vitro* sur une cible donnée ou encore le métabolisme par des enzymes hépatiques. La robotisation de ces tests est un exemple d'innovation permettant une sélection plus rapide des nombreuses molécules issues de la chimie combinatoire. Le développement de nombreuses techniques *in silico* est sans contredit un autre aspect important de la recherche pharmaceutique. On peut citer en exemple les analyses quantitatives de structure-activité (QSAR) qui tente de prédire l'activité ou encore le métabolisme de molécules afin de limiter le nombre de celles qui seront tester *in vitro*. En ce qui a trait aux phases pré-cliniques et cliniques du développement du médicament, les recherches dans le domaine de la modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique permettent d'optimiser l'utilisation des données

acquises dans l'élaboration des protocoles de recherches subséquents. Les techniques *in silico* sont donc utiles autant au niveau de la gestion de l'information que de la planification des études.

Voici quelques chiffres intéressants sur l'industrie pharmaceutique au Canada et aux États-Unis nous démontrant l'importance de la recherche dans ce domaine. On estime à environ 51.3 milliards \$US les dépenses en recherche et développement des compagnies pharmaceutiques aux États-Unis seulement [2]. Au Canada, le montant s'élevait à 889 millions en 2001 et 1.2 milliards en 2002, en \$CAN. Par comparaison avec le secteur manufacturier en général, la part de l'industrie pharmaceutique dans les dépenses totales en recherche et développement en 2001 s'élevait à 8% bien qu'elle ne produit que 1.9% du produit intérieur brut canadien [7, 8].

1.2 Processus de développement d'un médicament

Une des problématiques dans le grand processus du développement d'un médicament est la sous-utilisation des connaissances acquises dans les différentes phases de développement pour optimiser les suivantes. L'utilisation de techniques *in silico* est sans contredit une approche efficace pour gérer la grande quantité d'information générée par la recherche pré-clinique et clinique. Malgré l'intérêt grandissant et l'utilisation plus fréquente des techniques de modélisation pharmacostatistique, celles-ci ne sont pas utilisées à leur plein potentiel [9, 10]. Les découvertes dans le domaine biomédical explosent au niveau expérimental mais cette masse de connaissances ne s'est pas encore matérialisée au niveau thérapeutique. Un des grands défis dans les années à venir sera d'intégrer et de gérer l'explosion des connaissances biomédicales dans les différents domaines reliés au développement d'un médicament (chimie, biochimie, biologie, pharmacologie, biostatistique, etc.).

Avant qu'un médicament puisse être homologué pour fin de commercialisation par une agence réglementaire, de nombreuses étapes doivent être franchies, nécessitant plusieurs années de recherche et développement. Déjà, avant même d'en arriver à identifier des molécules avec un potentiel thérapeutique, beaucoup de recherches auront été effectuées afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à une maladie et pour identifier une cible

thérapeutique. Une fois qu'une molécule est identifiée comme ayant un potentiel thérapeutique, s'en suivent une longue série d'études ayant pour objectif de démontrer l'efficacité et l'innocuité du produit. On divise généralement les phases de développement d'un médicament en deux groupes, soient les études pré-cliniques et cliniques. On entend par étude pré-clinique toute étude faite dans un système *in vitro* ou *in vivo* chez les animaux. Les études cliniques sont quant à elles réalisées chez l'humain.

Le processus de sélection des molécules à l'étape de la découverte d'un médicament se fait beaucoup par des études effectuées *in vitro*. Les tests *in vitro* permettent de mieux comprendre la pharmacologie du médicament au niveau moléculaire et peuvent également permettre d'identifier les facteurs importants dans la pharmacodynamie et la réponse au médicament ainsi que de connaître les concentrations à cibler [11].

Les premières études *in vivo* se font chez les animaux. Les études de toxicité doivent se faire chez au moins deux espèces de mammifères, dont l'une autre que rongeur (par exemple chez le chien ou chez le singe). Ces études visent entre autres à caractériser la toxicité du produit dans certains organes cibles, et ce par rapport à la dose et à la durée du traitement. L'emphase est mise sur l'innocuité du produit sur les fonctions vitales comme le système nerveux central ou encore le système respiratoire. On évalue également si la toxicité est réversible ou non. La toxicité doit être évaluée suivant une dose unique (toxicité aiguë), souvent à des doses croissantes, et suivant des doses répétées (toxicité chronique). La durée des études à doses répétées dépend entre autres de la durée qu'auront les essais cliniques, mais de façon générale on devra présenter au minimum des études d'une durée de 2 semaines, 1 mois, 3 mois et 6 mois. L'ensemble des études pré-cliniques permet également de caractériser la toxicocinétique et la pharmacocinétique en obtenant des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du produit. Au cours de la phase pré-clinique, on veut également mieux connaître les fondements pharmacologiques, i.e. le mécanisme d'action, des principaux effets, que ce soit l'effet thérapeutique recherché ou encore d'effets secondaires, afin d'étayer la preuve du concept thérapeutique. On veut également caractériser la relation dose-effet (ou concentration-effet) ainsi que la durée de l'effet. Enfin on devra également considérer

la ou les voies possibles d'administration que l'on pourra utiliser pour les études cliniques. Les études pré-cliniques donnent des renseignements utiles pour estimer une dose de départ qui soit la plus sécuritaire possible pour les premiers essais cliniques chez les humains. La durée d'une étude clinique devra cependant être supportée par une étude de toxicité d'une durée égale ou supérieure. Les effets toxiques sur la reproduction doivent également être évalués ainsi que la génotoxicité. Cette dernière est généralement testée *in vitro* pour évaluer les mutations et les altérations chromosomiques. D'autres études pré-cliniques sont requises mais ne sont pas nécessairement complétées avant d'entamer les phases I et II du développement clinique. C'est souvent le cas par exemple des études de cancérogénicité [11, 12].

Les études cliniques ont pour objectif de démontrer l'efficacité et l'innocuité du produit chez l'humain. La classification en phase I, II, III et IV est probablement la plus répandue. Les études peuvent également être regroupées par type : pharmacologiques, thérapeutique exploratoire, thérapeutique confirmatoire et usage thérapeutique. Les études dites de Phase I sont généralement effectuées avec des petits groupes de volontaires sains. On veut d'abord évaluer l'innocuité et la tolérabilité à l'intérieur de la marge posologique prévue, à la fois pour des doses uniques et pour des doses répétées. Ces études permettent également de recueillir des données pharmacocinétiques importantes chez l'humain. On pourra ainsi évaluer entre autre la biodisponibilité du médicament et sa demie-vie d'élimination apparente, données importantes dans la détermination préliminaire des doses de médicament qui pourront être utilisées dans les études de Phase II. Si on dispose de mesures appropriées, on pourra également obtenir des données préliminaires sur la pharmacodynamie du produit. On doit cependant noter que les études de Phase 1 peuvent être effectuée directement chez des patients dans certains cas où le médicament présente une cytotoxicité comme c'est souvent le cas en oncologie. Certaines des études dites de phase I sont souvent effectuées durant les phases plus tardives du développement du médicament. C'est souvent le cas d'études visant à répondre à des questions plus spécifiques comme par exemple de déterminer la pharmacocinétique dans des sous populations telles des patients souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique, les enfants, les personnes âgées, etc. On peut également mentionner à titre d'exemple des études portant sur

l'effet de la nourriture sur la biodisponibilité du produit ou encore des études d'interactions médicamenteuses [4, 13].

Les études dites de phase II permettent généralement d'explorer le potentiel thérapeutique d'un produit chez des patients. Ce sont des études faites sur une population de patients relativement homogène, sélectionnés selon des critères assez stricts. Ces études sont réalisées avec un nombre restreint de patients, 24 à 300. C'est à cette étape que l'on tentera de faire la preuve du concept thérapeutique, i.e. de voir si le mécanisme d'action proposé chez l'animal se traduit par une activité cliniquement significative et ce avec un bon profil d'innocuité chez l'humain. Les études de phase II permettent également d'établir les doses et le régime posologique qui devraient être utilisés pour les études à plus grande échelle de phase III. On précisera également les paramètres à étudier ainsi que la méthodologie à utiliser pour les études confirmatoires de phase III. On tentera également de mieux préciser les populations cibles. Les études de phase III visent à confirmer les résultats préliminaires de la phase II tant pour l'innocuité que pour l'efficacité. On enrôle davantage de patients, de 250 à 1000, afin de pouvoir extrapoler les résultats à la population de patients en général. On veut également en connaître d'avantage sur les effets d'une administration prolongée si le médicament est destiné à être administré sur une longue période. Si les résultats de ces études confirmatoires s'avèrent positifs, le médicament peut alors être soumis aux autorités réglementaires afin d'obtenir l'approbation et être mis sur le marché. Les études cliniques ne sont pas pour autant terminées. Les études de phase IV visent à préciser l'usage thérapeutique du médicament et le rapport risques/bénéfices en général ou dans des situations particulières [4, 13].

Toutes les études ont pour but d'en arriver à l'approbation du médicament mais ultimement, ces études apportent l'information nécessaire à l'élaboration de la monographie du produit. L'objectif d'une monographie est de donner toute l'information nécessaire pour prendre une décision éclairée quant à l'utilisation du produit pour un patient. Les agences réglementaires comme Santé Canada ou la FDA aux États-Unis ont établi des monographies modèles comme document de référence accessible via internet [14, 15].

1.3 Sujet de la thèse

Le sujet de cette thèse porte sur l'optimisation de l'utilisation de technique de modélisation pharmacocinétique dans le cadre du développement des médicaments. Nous avons dans un premier temps évalué la pertinence de construire un modèle pharmacocinétique physiologique (PBPK) dans le cadre du processus de passage de l'étape pré-clinique à la première étude chez l'humain. Un modèle dit physiologique est un modèle prédisant le profil de concentrations d'un médicament à partir de données physiologiques indépendantes du médicament et physicochimiques spécifiques au médicament. Bien que ce genre de modèle soit relativement difficile à élaborer, il offre l'avantage théorique d'intégrer autant des données *in vitro* que *in vivo* chez l'animal. Nous avons comparé ce type de modélisation à l'allométrie, méthode beaucoup plus largement utilisée. Nous avons élaboré un modèle physiologique décrivant l'absorption intestinale en tenant compte du métabolisme et du transport au niveau du petit intestin. Le médicament modèle utilisé pour le modèle pharmacocinétique à base physiologique et l'allométrie est la cyclosporine. Afin d'obtenir des données pharmacocinétiques chez l'humain pour la cyclosporine pour valider le modèle PBPK, une étude portant sur l'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberges a préalablement été réalisée.

Nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps à différentes méthodes de modélisation pharmacocinétique, certaines utilisant une approche individuelle et d'autres une approche de population. On parle d'une approche individuelle lorsque les données pharmacocinétique de chaque individu sont analysées sans égard aux données des autres individus alors que par une approche de population, les données pharmacocinétiques de tous les individus de l'étude sont prises en considération. Plusieurs approches existent mais n'ont évidemment pas les mêmes forces et faiblesses. Les études comparatives réalisées par le passé ne se sont faites que sur un nombre très limité de modèles structuraux. Nous avons par contre comparé différentes méthodes d'analyse à l'aide d'une série de 46 d'études simulées pour représenter plusieurs types de modèles structuraux. Nous avons tenté d'identifier quelques éléments clés permettant d'identifier laquelle des méthodes de modélisation pharmacocinétique est la plus appropriée dans certains contextes donnés.

1.4 Références

1. U.S. Food and Drug Administration: Innovation or Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, publié par 2004, <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.pdf>
2. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, Pharmaceutical Industry Profile 2006. Washington, DC, PhRMA, March 2006,
3. Gorman RR: Drug Discovery dans Principles of Clinical Pharmacology, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001:365-71
4. Grudzinskas CV: Design of Clinical Development Programs dans Principles of clinical pharmacology, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001
5. Gouvernement du Canada: gouvernement PdsddDdded, Les produits pharmaceutiques et la protection accordée par les brevets (BP354f), publié par 2002, <http://dsp-psd.tpsgc.gc.ca/Collection-R/LoPBdP/BP/bp354-f.htm>
6. Lazo JS, Wipf P. Combinatorial Chemistry and Contemporary Pharmacology. JPET 2000; 293(3):705-9
7. Schellings R, Bulletin de service: Statistique des sciences, édité par Statistique Canada, Ottawa, 2005, <http://www.statcan.ca:8096/bsolc/francais/bsolc?catno=88-001-X>
8. Statistique Canada: Division des mesures et de l'analyse des industries, Produit intérieur brut par industrie, publié par le Ministre de l'industrie, 2002, <http://www.statcan.ca/francais/freepub/15-001-XIF/0070215-001-XIF.pdf>
9. Bhattaram VA et al. Impact of pharmacometric reviews on new drug approval and labeling decisions--a survey of 31 new drug applications submitted between 2005 and 2006. Clin Pharmacol Ther 2007; 81(2):213-21
10. Bhattaram VA et al. Impact of pharmacometrics on drug approval and labeling decisions: a survey of 42 new drug applications. Aaps J 2005; 7(3):E503-12

11. Takimoto CH, Khleif SN: Preclinical Drug Development dans Principles of Clinical Pharmacology, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001:373-85
12. Santé Canada: Direction des produits thérapeutiques, Calendrier des études d'innocuité pré-cliniques pour la conduite d'essais cliniques de produits pharmaceutiques sur des sujets humains, publié par Santé Canada - Publications, 1998,
13. Santé Canada: Direction générale des produits de santé et des aliments, Ligne directrice à l'intention de l'industrie: Considérations générales relatives aux études cliniques, publié par Santé Canada - Publications, 1997, http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/efficac/e8_f.html
14. Santé Canada: aliments Dgdpdsed, Ligne directrice à l'intention de l'industrie: Monographies de produit, publié par Santé Canada - Publications, 2003, http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/pm_mp_f.pdf
15. U.S. Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research, Targeted Product Information Template, publié par 2006, <http://www.fda.gov/cder/tpi/tpitmpl5.htm>

Chapitre 2

Recension de la littérature

2.1 Analyse pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude du devenir d'un médicament dans l'organisme dans le temps. Par devenir on entend la façon dont un médicament sera absorbé, distribué, métabolisé et éliminé. Suite à l'administration d'un médicament on fera des prélèvements, le plus souvent sanguins, et on y mesurera la concentration du médicament. On obtient ainsi un profil des concentrations en fonction du temps. Différentes méthodes d'analyse des données pharmacocinétiques existent et on peut les diviser en deux grandes familles, soient l'analyse noncompartimentale et l'analyse compartimentale. Cette dernière peut par ailleurs se faire sur une base individuelle ou par une approche de population. L'analyse ou modélisation pharmacocinétique consiste en fait à traduire en langage mathématique les données afin de les simplifier pour mieux les décrire et les prédire et ainsi optimiser les études subséquentes.

Même si un médicament démontre une très grande activité agoniste ou antagoniste sur un récepteur *in vitro*, s'il n'est pas absorbé ou s'il est éliminé trop rapidement, il pourrait n'y avoir aucune activité *in vivo*. La modélisation pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) est une composante extrêmement importante dans le développement d'un médicament afin de caractériser et de faire le lien entre les concentrations systémiques obtenues et les effets observés du médicament. L'analyse pharmacométrique (PK, PD, statistiques) des données pendant tout le long du processus de développement d'un médicament permet de démontrer l'efficacité et l'innocuité, d'évaluer le ratio bénéfice-risque, d'optimiser les doses pour les études subséquentes, d'évaluer les doses dans des populations spéciales (pédiatrique, insuffisance rénale...), bref de mieux suivre et planifier les études nécessaires à l'approbation du médicament. Deux études portant sur la perception de la FDA quant à la pertinence et à l'importance des analyses pharmacométriques dans l'approbation d'un médicament et le

développement de la monographie ont été réalisées entre 2000 et 2006 par des membres du Centre d'évaluation et de recherche sur les médicaments (CDER) de la FDA. Ces deux études ont révélé que l'information apportée par des analyses pharmacométriques lorsqu'elles sont réalisées, était essentielle dans le processus décisionnelle des réviseurs, à savoir si l'usage d'un médicament doit être approuvé, refusé ou que l'on requiert que des études supplémentaires soient effectuées. Dans les cas où l'information obtenue par les analyses pharmacométriques n'était pas jugée essentielle, elle venait du moins supporter leurs décisions prises avec d'autres types de données [1, 2]. Il n'en demeure pas moins que les techniques de modélisation ne sont pas utilisées à leur plein potentiel. On peut prendre l'exemple des études dose-réponse qui sont souvent analysées séparément et qui pourtant gagneraient à être intégrées l'une après l'autre, toujours dans le but d'optimiser le régime posologique de l'étude suivante, sauvant ainsi temps et argent. Le temps et l'argent requis pour réaliser une analyse pharmacométrique est négligeable par rapport au coût d'une étude clinique réalisée inutilement. Il reste beaucoup de travail à accomplir au niveau de l'intégration de toute l'information générée de l'étape de la découverte à la mise en marché. La modélisation constitue un outil complexe mais essentiel à l'intégration des données au cours du processus de développement [1, 3]. Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans une optique d'optimisation de l'utilisation de méthodes d'analyse pharmacocinétique, i.e. dans le but d'aider à mieux comprendre dans quelle circonstance certaines techniques sont préférables à d'autres.

2.1.1 *Analyse noncompartimentale*

L'analyse noncompartimentale du profil des concentrations plasmatiques ou sanguines (C) d'un médicament en fonction du temps (t) est basée sur la théorie des moments statistiques (S) [4-8]. En pharmacocinétique, on se sert essentiellement des deux premiers moments. Le premier moment, S_0 , représente l'aire sous la courbe (AUCinf) et est une mesure de l'exposition d'un organisme à un médicament.

$$S_0 = \int_0^{\infty} C(t)dt = AUC_{inf} \quad (1)$$

Le deuxième moment, S_1 , représente l'aire sous les moments de la courbe (AUMC).

$$S_1 = \int_0^{\infty} t \cdot C(t) dt = AUMC_{inf} \quad (2)$$

Bien que ce paramètre n'ait pas de signification particulière en pharmacocinétique, il sert au calcul d'autres paramètres. En effet, on peut également s'intéresser au temps de résidence moyen (MRT) qu'aura un médicament dans un organisme. Ce paramètre se calcule à partir du profil des concentrations en fonction du temps obtenu suite à une administration intraveineuse d'un médicament sur un temps d'infusion t_{inf} .

$$MRT = \frac{AUMC_{inf}}{AUC_{inf}} - \frac{t_{inf}}{2} \quad (3)$$

La clairance (CL), qui est une mesure de la capacité d'un organisme à éliminer de façon irréversible un médicament, peut aussi être obtenue par analyse noncompartimentale.

$$CL = \frac{F \cdot Dose}{AUC_{inf}} \quad (4)$$

où F est la biodisponibilité du médicament suite à une dose simple, relativement à une biodisponibilité de 1 pour une administration intraveineuse.

$$F = \frac{AUC_{inf_{PO}} \cdot Dose_{IV}}{AUC_{inf_{IV}} \cdot Dose_{PO}} \quad (5)$$

Ainsi on pourra également estimer le volume de distribution total apparent d'un médicament (V_{ss}).

$$V_{ss} = CL \cdot MRT \quad (6)$$

Il est à noter que la fonction C(t) énoncée dans les équations 1 et 2 n'est pas connue et qu'on doit plutôt estimer AUC_{inf}. On calcule d'abord l'aire sous la courbe du temps zéro jusqu'au temps 'n' de la dernière concentration mesurable (AUC_t). Une façon classique et robuste de calculer AUC_t est la méthode linéaire des trapèzes dans la portion ascendante du profil des concentrations

$$AUC_t = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2} \quad (7)$$

et log-linéaire dans la portion descendante du profil des concentrations.

$$AUC_t = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{\ln(C_i/C_{i-1})} \quad (8)$$

On détermine ensuite la constante d'élimination apparente de premier ordre (kel) par une régression linéaire des moindres carrés des concentrations en fonction du temps sur une échelle log-linéaire, en utilisant au moins trois points dans la phase terminale d'élimination. La pente obtenue par cette régression linéaire représente alors la valeur de $kel/2.3$. On peut ensuite compléter le calcul de l'AUCinf.

$$AUC_{inf} = AUC_t + \frac{C_{last}}{kel} \quad (9)$$

où C_{last} est la dernière concentration mesurable. On veut cependant que la partie extrapolée (C_{last}/kel) soit minime, généralement moins de 20%. Enfin l'estimation du kel permet de calculer la demie-vie d'élimination apparente d'un médicament ($T_{1/2}$) qui est le temps requis pour que les concentrations d'un médicament dans l'organisme diminuent de moitié.

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{kel} \quad (10)$$

Moyennant un échantillonnage assez riche (12-15 observations réparties dans les phases d'absorption, de distribution et d'élimination), l'analyse noncompartimentale est une méthode simple, robuste et rapide qui peut être utilisée de façon routinière. De plus, les résultats sont indépendants de l'analyste. Cependant, elle ne s'applique pas si la cinétique du médicament n'est pas linéaire. De plus, les paramètres comme MRT et V_{ss} ne peuvent pas être calculés suite à une administration orale.

2.1.2 Analyse compartimentale

Les modèles compartimentaux représentent l'organisme comme étant un système à un ou plusieurs compartiments, sans signification physiologique directe. Chaque compartiment est défini par un certain volume à l'intérieur duquel la concentration du médicament est homogène. La vitesse de transfert entre les compartiments ainsi que la vitesse d'élimination à partir d'un

compartiment sont le plus souvent décrites par des processus linéaires de premier ordre. Il arrive cependant que l'on doive décrire l'élimination par des équations non linéaires ou encore l'absorption par un processus d'ordre zéro. L'analyse compartimentale permet d'accommoder tous les types de modèles. Mathématiquement, on peut spécifier le modèle par des équations différentielles ou encore par des matrices ou des équation intégrées dans le cas de modèles plus simples [8].

Nous décrivons les modèles par des équations différentielles tout au long de ce travail étant donné qu'elles peuvent être appliquées à tous les modèles. Il existe différentes façons de paramétriser les équations. Tout au long de ce travail, les paramètres de base pour chaque compartiment étaient le volume et la clairance. Cette dernière pourrait également être remplacée par des constantes de vitesse. Le modèle le plus simple est le modèle à un seul compartiment décrivant une décroissance monoexponentielle des concentrations. Ce modèle s'applique généralement à des médicaments qui se distribuent rapidement dans le corps à partir de la circulation systémique. On échantillonne typiquement dans le sang et le compartiment central reflète ce qui se passe à ce niveau. Il est à noter également qu'on assume généralement que l'élimination se fait à partir du compartiment central (système mamillaire). La Figure 1 donne l'exemple du profil plasmatique pour un médicament administré oralement et présentant une décroissance monoexponentielle des concentrations.

Mis à part des études où l'on veut spécifiquement évaluer la biodisponibilité d'un médicament, il n'est pas de pratique courante d'administrer le médicament par voie intraveineuse lors d'études portant sur la pharmacocinétique d'un médicament suite à une administration orale ou autre qu'intraveineuse. La valeur de F n'est donc souvent pas connue et on rapporte alors les valeurs de V/F et CL/F pour le volume et la clairance. Une fois que le médicament a atteint la circulation systémique, il mettra dans les faits un certain temps à se distribuer dans les différents organes. Le temps requis pour atteindre un équilibre dynamique entre le plasma et les organes va dépendre de la perfusion aux différents organes mais aussi des propriétés physico-chimiques du médicament et de la présence de processus tel que le transport actif. Le déclin des concentrations plasmatiques peut alors prendre une forme

multiexponentielle dont l'aspect est une résultante hybride des différents équilibres dynamiques en place. La Figure 2 illustre l'exemple d'un modèle à deux compartiments suivant l'administration orale d'un médicament.

Le nombre d'exponentielles observées va aussi dépendre de la fréquence des prélèvements et des temps auxquels les échantillons sont pris mais on dépasse rarement trois exponentielles. Les modèles compartimentaux ne se limitent bien évidemment pas à ceux présentés aux Figure 1 et Figure 2. L'élimination peut être divisée en différentes composantes, rénale et non-rénale par exemple, ou encore présenter les caractéristiques d'une élimination saturable décrite par une équation de type Michaelis-Menten. L'administration du médicament peut être sous n'importe quelle forme : intraveineuse, orale, sous-cutanée, intramusculaire, etc. L'absorption peut être modélisée par plus d'une constante de vitesse d'absorption de premier ordre K_a et on peut également considérer une absorption d'ordre zéro. Le modèle structural que l'on peut construire dépend des propriétés du médicament et du type de données disponibles. Par exemple pour un médicament éliminé en partie par voie rénale. S'il n'y a que des données plasmatiques, on pourra construire un modèle où l'élimination sera représentée par une valeur globale de clairance (ou de constante d'élimination, selon la paramétrisation utilisée). Par contre, si on a à la fois des données plasmatiques et urinaires, on pourra alors distinguer dans notre modèle l'élimination par voie rénale des autres voies d'élimination. La qualité des données influencera elle aussi la qualité du modèle obtenu.

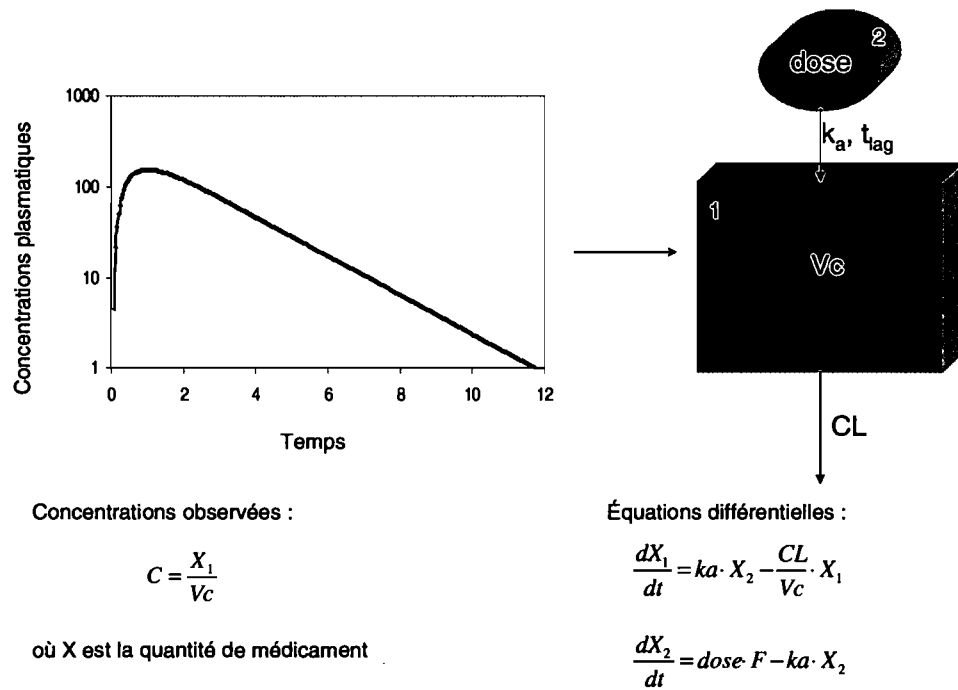
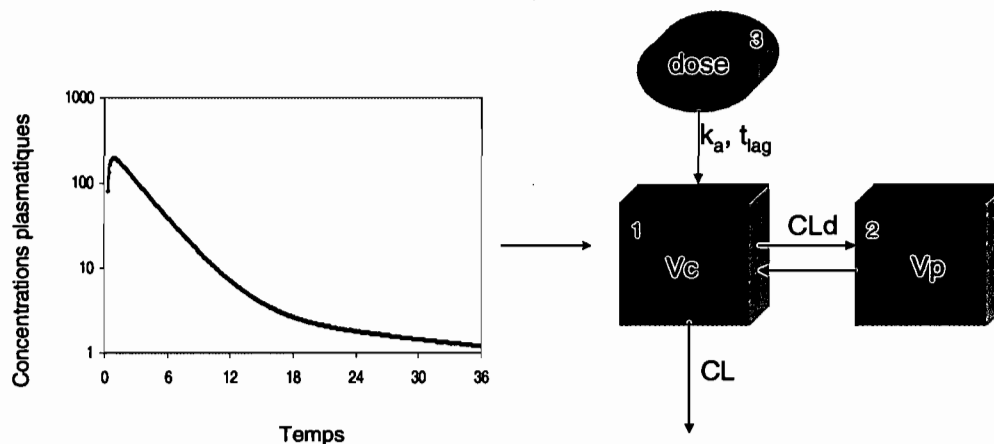


Figure 1: Représentation schématique d'un modèle à un compartiment suivant une administration orale d'un médicament avec une constante d'absorption k_a (h^{-1}), un temps de latence t_{lag} (h), un volume de distribution V_c (L), une clairance d'élimination CL (L/h) et une biodisponibilité F .



Concentrations observées (C) :

$$C = \frac{X_1}{V_c}$$

où X est la quantité de médicament

Équations différentielles :

$$\frac{dX_1}{dt} = K_a \cdot X_3 - \frac{CL_d}{V_c} X_1 + \frac{CL_d}{V_p} X_2 - \frac{CL}{V_c} X_1$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \frac{CL_d}{V_c} X_1 - \frac{CL_d}{V_p} X_2$$

$$\frac{dX_3}{dt} = Dose \cdot F - K_a \cdot X_3$$

Figure 2: Représentation schématique d'un modèle à deux compartiments suivant une administration orale d'un médicament avec une constante d'absorption k_a (h^{-1}), un temps de latence t_{lag} (h), un volume de distribution du compartiment central V_c (L), un volume de distribution du compartiment périphérique V_p (L), une clairance d'élimination CL (L/h), une clairance de distribution CL_d (L/h) (où $CL_{d1 \rightarrow 2} = CL_{d2 \rightarrow 1}$) et une biodisponibilité F .

Un modèle structural, si bon soit-il, ne décrira jamais parfaitement les observations et il y aura toujours une certaine incertitude sur chacune des observations. L'erreur sur une mesure est le résultat des incertitudes sur la dose, les temps de prélèvements, variabilité de la méthode d'analyse, etc. Par conséquent, en plus du modèle structural on doit considérer un modèle de variance. Pour une concentration observée $y_{j,obs}$ au temps j , il y a une erreur résiduelle ε_j qui lui est associée de sorte que la relation entre la valeur observée et la valeur prédite par le modèle $y_{j,pred}$ est

$$y_{j,obs} = y_{j,pred} + \varepsilon_j \quad (11)$$

On fait l'hypothèse que les ε_j sont aléatoires, indépendants d'une mesure à l'autre et ont une distribution normale avec une moyenne de 0 et une variance $Var(\varepsilon_j)$ décrite par une équation linéaire définie en fonction des valeurs prédites par le modèle [9, 10]:

$$Var(\varepsilon_j) = Var(y_{j,obs}) = (y_{j,pred} \cdot \sigma_{slope} + \sigma_{inter})^2 \quad (12)$$

où σ_{slope} et σ_{inter} sont la pente et l'ordonnée à l'origine du modèle de variance et sont des paramètres modélisés au même titre que les paramètres pharmacocinétiques du modèle structural. Un tel modèle est dit proportionnel (σ_{slope}) et additif (σ_{inter}) et est le plus couramment utilisé. Dans un modèle avec une distribution normale, on peut définir la variabilité résiduelle sur les concentrations par l'équation suivante :

$$\%CV_{resid} = 100 * (\sigma_{slope} + \frac{\sigma_{inter}}{\bar{y}_{pred}}) \quad (13)$$

Le principe de parcimonie est un principe de base de la modélisation compartimentale. On choisit toujours le modèle le plus simple nous permettant de décrire le plus adéquatement possible nos données. L'ajout de paramètres supplémentaires, tel que pour l'ajout d'un compartiment supplémentaire, pourra toujours mieux prédire les concentrations. Pour que le gain soit jugé significatif, on doit faire appel à un critère objectif ou un à un test statistique nous permettant de trancher la question. Le critère objectif le plus utilisé en pharmacocinétique pour juger de la pertinence de l'ajout de paramètres supplémentaires est le critère d'Akaike (AIC)

[11]. Le critère d'AIC n'est pas un test statistique mais plutôt un critère de sélection basé sur le concept de maximisation de l'entropie. Le critère d'AIC tient compte du fait qu'en augmentant le nombre de paramètres, il y a une perte de degrés de liberté et donc diminution de l'entropie. Il tient compte aussi bien sûr du fait que l'on veut que le modèle explique le mieux possible les données. Dans sa forme générale, le critère d'AIC utilise l'estimateur du maximum de vraisemblance L (estimateur décrit à la section 2.1.4) comme mesure de la distance entre le modèle testé et les observations.

$$AIC = -2 \ln L + 2p \quad (14)$$

où p est le nombre de paramètres du modèle. On veut donc que la valeur d'AIC soit la plus petite possible. On voit d'après l'équation 14 qu'un bon ajustement des données donne une petite valeur de ' $-2 \ln(L)$ ' mais que le terme ' $2p$ ' ajoute une pénalité pour le nombre de paramètres utilisés [12]. Le critère d'AIC peut se formuler autrement. Pour le cas qui nous intéresse, si les erreurs du modèle sont distribuées normalement et sont indépendantes, la mesure de la distance entre le modèle testé et les observations peut être décrite par la somme des moindres carrés (SS). Le critère d'AIC prend alors la forme suivante :

$$AIC = N \ln SS + 2p \quad (15)$$

où N est le nombre de mesures expérimentales [13]. Il existe d'autres critères permettant de choisir le meilleur modèle. Le critère de Schwarz ressemble au critère d'AIC et mène la plupart du temps aux mêmes conclusions que le critère d'AIC. Le facteur ' $2p$ ' de l'équation 15 est remplacé par un facteur ' $p \cdot \ln(N)$ '. Tout comme pour le critère d'AIC, on cherche également le modèle donnant la plus petite valeur du critère de Schwarz. Les critères d'AIC et de Schwarz peuvent être utilisés pour comparer des modèles qu'ils soient reliés ou non. Comme le facteur de pénalité du critère d'AIC ($2p$) est plus petit que celui du critère de Schwarz ($p \cdot \ln(N)$), il favorise davantage l'ajout de paramètres que ce dernier. Notons cependant que les deux critères sont dérivés de façon différente. Le critère d'AIC provient d'un cadre statistique probabiliste alors que le critère de Schwarz provient d'un cadre statistique bayésien [14]. Dans le contexte de l'analyse compartimentale en pharmacocinétique, les critères d'AIC et de Schwarz performant de façon adéquate [15]. Il existe également le test de F qui permet de

comparer des modèles si l'un est une simplification de l'autre. Le test de F est un test statistique qui a pour hypothèse nulle que le modèle le plus simple est le meilleur et utilise $\alpha=0.05$. Il faut donc avoir un bon échantillonnage pour que les données rendent bien compte que le modèle plus complexe est le meilleur pour que l'hypothèse nulle soit rejetée. Donc si l'ajustement des données avec le modèle plus complexe ne diffère pas beaucoup ou si l'échantillonnage n'est pas suffisant (souvent le cas dans des essais cliniques chez des patients), le test de F aura tendance à sélectionner le modèle le plus simple même si c'est le plus complexe qui est le bon [15]. Mentionnons enfin le coefficient de corrélation qui, bien qu'il donne une appréciation de la qualité du fit, ne doit cependant pas être utilisé comme seul critère pour le choix d'un modèle. En effet, le coefficient de corrélation est une mesure du degré d'association linéaire existant entre deux variables (valeurs prédites vs valeurs mesurées dans le cas de la modélisation pharmacocinétique). Plus le coefficient de corrélation est près de 1 et meilleur est l'association. On pourrait donc avoir un bon coefficient de corrélation mais systématiquement surestimer les concentrations. À l'inverse, on pourrait faire de bonnes prédictions mais avoir un faible coefficient de corrélation dû à la dispersion des observations [16, 17].

Contrairement à l'analyse noncompartimentale, l'analyse compartimentale offre l'avantage de s'appliquer à tous les types d'administration et aux cinétiques linéaire et non linéaire. Elle permet également de lier les données pharmacocinétiques à la modélisation pharmacodynamique. Elle est par contre plus complexe, moins robuste et le temps d'analyse est beaucoup plus long que l'analyse noncompartimentale. Il est à noter toutefois que les modèles pharmacocinétiques compartimentaux ne sont pas les plus complexes, pensons aux modèles physiologiques ou encore aux modèles incluant la pharmacodynamie (PKPD).

2.1.3 Les estimateurs

Lorsqu'on modélise des données, un algorithme va chercher à optimiser les valeurs des paramètres qui vont le mieux prédire les données expérimentales. Pour ce faire, on doit avoir une fonction objective, généralement à minimiser, qui va servir de critère de référence [10, 18,

19]. L'estimateur du moindre carré standard (OLS : ordinary least-squares) est le plus simple. Pour un individu i pour lequel on a des observations aux temps j et dont les concentrations sont prédites par une fonction $f(t_j, \phi_i)$ où ϕ_i représente l'ensemble des paramètres pour cet individu, la fonction objective O_{OLS} est alors :

$$O_{OLS} = \sum_j [y_{ij} - f(t_j, \phi_i)]^2 \quad (16)$$

Cet estimateur ne suppose aucune distribution des données ou des paramètres. Par contre, on ne l'utilise pas dans le cas de la pharmacocinétique car la plage de valeurs des concentrations est très grande, souvent deux ou trois ordres de grandeur, ce qui fait que les petites concentrations se voient accorder très peu d'importance dans la valeur de la fonction objective alors qu'elles sont toutes aussi importantes que les grandes. L'estimateur par moindres carrés pondérés (WLS : weighted least squares) apporte une solution à ce problème en mettant un poids w_j sur chacune des observations. La fonction objective (O_{WLS}) devient alors :

$$O_{WLS} = \sum_j \frac{[y_{ij} - f(t_j, \phi_i)]^2}{w_j} \quad (17)$$

Une façon classique de procéder en pharmacocinétique est de donner à w_j la valeur de la concentration prédite. Mais on peut aussi utiliser la variance comme poids afin d'accorder plus d'importance aux valeurs sur lesquelles il y a moins d'incertitude. Il existe également ce qu'on appelle la méthode des moindres carrés généralisée (GLS : generalized least squares). Il s'agit d'un processus itératif au cours duquel on fait une première estimation des paramètres en utilisant O_{OLS} . L'étape 2 consiste à estimer la variance sur chacune des observations étant donné les premiers estimés des paramètres. L'estimation de la variance peut se faire à l'aide d'un autre estimateur, le maximum de vraisemblance [10]. Cet estimateur est décrit dans la section suivante portant sur l'analyse de population. À l'étape 3, les valeurs de variance trouvées à l'étape 2 sont utilisées pour réestimer la valeur des paramètres en utilisant O_{WLS} . Les étapes 2 et 3 sont répétées de façon successive jusqu'à ce que les résultats aient convergé, i.e. qu'ils ne varient à peu près plus d'une itération à l'autre.

2.1.4 Analyse compartimentale de population

L'analyse compartimentale individuelle est une analyse faite sur le profil des concentrations d'un seul individu à la fois, sans égard aux profils des concentrations des autres individus de l'étude. Ce type d'analyse fonctionne bien moyennant un échantillonnage adéquat, i.e. des échantillons bien répartis dans les différentes phases du profil et au moins autant d'observations que de paramètres à estimer. Ce genre d'échantillonnage est relativement facile à obtenir dans des études de phase I avec des volontaires sains dans des cliniques dédiées à ce type de recherche. Cependant, lorsque qu'il s'agit études de phase II et III chez des patients, on doit souvent limiter le nombre de prélèvements pour des raisons éthiques et pratiques et le nombre d'observations est souvent moindre que le nombre de paramètres à estimer. De plus, les temps d'administration des médicaments et de prélèvements (sanguins ou autres) sont parfois incertains. Des méthodes d'analyse de population ont donc été développées pour tenir compte de cette réalité.

Le développement des méthodes de population repose en grande partie sur les travaux innovateurs de Lewis B. Sheiner et de ses collaborateurs, initiés dans les années 1970 [20-26]. L'approche populationnelle de l'analyse compartimentale situe les individus par rapport à une population plutôt que de décrire une population par rapport aux individus observés comme c'est le cas dans une analyse individuelle. Pour ce faire, on utilise un cadre mathématique reposant sur les principes statistiques de Bayes. Le théorème de Bayes est une reformulation de la formule définissant une probabilité conditionnelle. Supposons un paramètre θ dont on veut connaître la valeur. Nous n'en observerons jamais la vraie valeur mais pouvons faire un certain nombre d'observations sur ce paramètre. Dans l'univers Bayésien, on va d'abord imputer une valeur *a priori* à θ , valeur que l'on estime au meilleur de sa connaissance. On fait ensuite des observations expérimentales X_i de θ . On appelle la vraisemblance (*likelihood*) la probabilité d'avoir fait l'observation X_i étant donné la valeur *a priori* de θ . Ce qui nous intéresse finalement c'est la probabilité que θ soit vrai étant donné que nous avons fait les observations X_i , c'est la probabilité *a posteriori*. Le théorème de Bayes se définit comme suit [17]:

$$posteriori = \frac{priori \times vraisemblance}{\sum (priori \times vraisemblance)} \quad (18)$$

La sommation au dénominateur représente en fait la probabilité marginale (ou jointe) de tous les X_i possibles. C'est donc dans ce cadre statistique que sont construits les modèles pharmacocinétiques de population (ou pharmacostatistiques). Prenons l'exemple d'un paramètre qui est une variable continue dont on estime que la valeur *a priori* est distribuée normalement avec moyenne μ et une variance σ^2 et sur laquelle nous avons un ensemble de mesures v_i . La fonction de densité de notre valeur *a priori* $g(\mu)$ est donné par :

$$priori \rightarrow g(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot var}} e^{\frac{-1}{2 \cdot var} (\mu - mean)^2} \quad (19)$$

Où 'var' et 'mean' sont les valeurs de départ imputées à σ^2 et μ respectivement. On peut également calculer la vraisemblance jointe d'avoir une valeur de μ étant donné notre série d'observations $f(v_i, \dots, v_n | \mu)$.

$$vraisemblance \rightarrow f(v_i, \dots, v_n | \mu) = \prod_{i=1}^n f(v_i | \mu) \quad (20)$$

Comme μ est une variable continue, le dénominateur de l'équation 18 prend la forme d'une intégrale.

$$\sum (priori \times vraisemblance) \rightarrow \int g(\mu) \times f(v_i, \dots, v_n | \mu) d\mu \quad (21)$$

Les équations 19 à 21 s'appliquent à l'estimation d'un seul paramètre [17]. Pour le cas du modèle pharmacostatistique, il s'agit d'un modèle hiérarchique dans lequel on définit d'abord chaque individu par un modèle structural (nombre de compartiments, type d'absorption, type d'élimination, etc) et un terme de variabilité résiduelle (voir équation 11) aussi appelée variabilité intraindividuelle. Pour chaque individu i , cette dernière est définie par des variables ϵ_i représentant les composantes proportionnelle et additive (dépendamment en fait du modèle de variance choisi). Les ϵ_i sont normalement distribuées avec une moyenne zéro et une variance σ^2 . On dénote la matrice de covariance des σ^2 par le symbole Σ . Le niveau suivant du modèle hiérarchique décrit la pharmacocinétique de la population, i.e. la relation entre les individus. Les

paramètres pharmacocinétiques d'un individu i , ϕ_i , sont considérés comme venant d'une population avec moyenne θ (effet fixe) et fonction d'un écart individuel η_i (effet aléatoire).

$$\phi_i = \theta + \eta_i \quad (22)$$

Le terme η_i inclut tous les effets interindividuels qu'on ne peut pas quantifier ou modéliser. On considère donc ces effets comme étant aléatoires et indépendants d'un individu à l'autre. Les η_i ont une distribution normale (ou log-normale) avec une moyenne 0 et une variance ω^2 . Ainsi chaque observation au temps j pour un individu i (y_{ij}) peut être définie par la relation suivante :

$$y_{ij} = f(t_j, \theta, \eta_i) + \varepsilon_{ij} \quad (23)$$

La matrice Ω est la matrice de covariance des ω^2 de la population, le vecteur des paramètres θ de la population est dénoté par Θ et Σ dénote la matrice des ε_{ij} [27]. La pharmacocinétique de la population peut donc entièrement être décrite à partir des termes Σ , Ω et Θ et chaque individu sera défini à l'intérieur de cette population. Lorsqu'on fait l'analyse de population des données on cherche donc à estimer à la fois les paramètres pharmacocinétiques (Θ), la variabilité interindividuelle de ces paramètres (Ω) et la variabilité intraindividuelle (Σ). La partie la plus difficile à calculer dans l'estimation Bayésienne des paramètres est la vraisemblance marginale (ou jointe) que l'on retrouve au dénominateur. D'abord pour déterminer la vraisemblance de l'ensemble des observations pour chaque individu (dénoté par la fonction L_i), on doit prendre en considération la vraisemblance des observations par rapport aux paramètres pharmacocinétiques de cet individu (dénoté par la fonction l_i) ainsi que de la vraisemblance de ces paramètres par rapport aux paramètres de la population en général (dénoté par la fonction h_i). Ainsi

$$L_i = \int l_i(y_i | \eta_i) \cdot h_i(\eta_i | \mu, \Omega) d\eta \quad (24)$$

Pour l'ensemble des individus, la vraisemblance jointe L sera :

$$L = \prod_i L_i \quad (25)$$

L'idée est donc de trouver les valeurs de Σ , Ω et Θ qui vont maximiser L , i.e. de trouver les paramètres (fixes et aléatoires) qui rendent l'ensemble des observations le plus probable [28-

30]. Il est à noter que la plupart du temps on utilise le négatif de la fonction L transformée sur une échelle logarithmique et on va alors minimiser la fonction plutôt que de la maximiser.

Étant donnée que les équations pharmacocinétiques décrivant l'évolution des concentrations dans le temps ne sont pas linéaires par rapport à leurs paramètres, il n'existe pas de solution analytique à L . Plusieurs méthodes ont été publiées et de nombreux logiciels ont été mis sur le marché, chacun abordant le problème de l'approximation de l'intégrale de l'équation 24 de façon différente. Le détail des méthodes qui ont été utilisées dans ce travail se trouve au chapitre suivant (Méthodologie).

Les méthodes de population donnent généralement de meilleurs résultats que les méthodes individuelles. Étant donné que l'analyse de population évalue la variabilité sous deux aspects, intra et interindividuelle, on en obtient généralement de meilleurs estimés que par les méthodes individuelles qui, de par leur nature, négligent la composante interindividuelle. Ensuite dans des cas où l'échantillonnage chez les individus est limité, par exemple dans des études de phase II et III, cela permet d'obtenir de meilleurs estimés étant donné que les observations de tous les individus sont mises à contribution dans l'analyse. En autant que les individus fassent partis de la même population, les estimés seront meilleurs. Par contre, la modélisation par les méthodes de population permet également d'inclure des covariables telles que l'âge, le poids, la clairance à la créatine, etc, ce qui permet d'évaluer s'il y a des populations d'individus sous-jacentes. Enfin l'approche de population permet de modéliser la variabilité inter-occasionnelle qu'il peut y avoir entre différentes périodes de traitements [23, 25-27, 31-33].

Certaines méthodes individuelles et de population ont déjà été comparées par le passé. Les comparaisons avaient pour but d'évaluer les habiletés des différentes méthodes à ajuster soit des données simulées [23-26, 30, 34-40] ou bien des données cliniques réelles [31, 37, 41-49]. Un des premiers logiciels dédié à l'analyse populationnelle à avoir vu le jour et probablement le plus connu est NONMEM (pour Nonlinear Mixed-Effect Modeling). La méthodologie proposée pour NONMEM a largement été comparée à celle du "Standard-Two-Stage" (STS) [23-26, 31, 35, 37, 43, 44, 49]. Cette dernière est une méthode individuelle à la base et estime les paramètres PK dans un premier temps puis la variabilité populationnelle dans

un second. Toutes les comparaisons entre ces deux méthodes, que ce soit pour des données simulées ou réelles, se sont faites sur un nombre très limité de modèles structuraux. Nous avons donc décidé de faire une comparaison entre différentes méthodes d'analyse compartimentale individuelle et de population sur un plus grand nombre de modèles structuraux, chose qui n'avait jamais été faite par le passé. Les modèles varient entre autre en terme de nombre de compartiments, type d'échantillonnage et de nombre de sujets. Cette étude est présentée au Chapitre 6. Le but de cette étude comparative était d'évaluer la capacité de différentes méthodes à estimer les vraies valeurs de moyenne et de variance de population des paramètres PK, la variabilité résiduelle ainsi que les paramètres PK individuels.

2.2 Développement du médicament : passage de l'étape pré-clinique à clinique

De tout le processus de développement d'un médicament, une des premières décisions difficiles est sans doute celle d'entreprendre ou non les phases d'études chez l'humain. Si d'après toutes les données pré-cliniques, *in vitro* et animales, le médicament est jugé comme offrant un bon potentiel thérapeutique tout en étant relativement sécuritaire, on pourra décider de commencer les études cliniques. Si tel est le cas, le choix de la dose qui sera administrée pour la première fois à un humain est un choix crucial. Cette dose se doit d'être d'abord et avant tout sécuritaire. Toutefois, une dose de départ trop faible rallonge le temps nécessaire à l'optimisation des doses à utiliser. Dans l'autre sens, une dose de départ trop élevée augmente les risques de toxicité. Il n'y a pas de méthode universelle et aucune ne fait l'unanimité quant à la meilleure façon de déterminer la dose initiale. Toutefois, la FDA a publié des lignes directrices qui décrivent bien la méthode traditionnelle pouvant être employée à cette étape importante dans le développement d'un médicament [50].

2.2.1 Extrapolation à l'humain à partir de la détermination du NOAEL

Lorsque la décision d'entreprendre les études chez l'humain se prend, les études de toxicité se doivent d'être complétées chez les animaux. Durant ces études, on aura observé quels sont

les effets indésirables à des doses uniques ou répétées et si ces effets sont réversibles. À partir de ces observations, on peut déterminer la dose qui sera administrée lors de la première étude chez l'humain par le processus suivant. La première étape dans l'évaluation d'une dose de départ acceptable chez l'humain est la détermination du 'NOAEL' pour 'No Observed Adverse Effect Levels' pour chacune des espèces utilisées lors des études de toxicité. Nous conserverons l'abréviation anglophone de 'NOAEL' car c'est probablement la dénomination la plus connue. Pour une espèce animale donnée, le NOAEL est définie comme la plus haute dose pouvant être administrée sans qu'il y ait une augmentation significative des effets secondaires indésirables par rapport au groupe témoin. La définition d'un effet secondaire indésirable dans le contexte d'une étude pré-clinique n'est pas nécessairement facile à établir et va dépendre du type de thérapie envisagée et de la classe de médicaments. Cependant, on peut dire qu'en général un effet secondaire indésirable considéré pour l'évaluation du NOAEL devrait être un effet qui serait inacceptable s'il se produisait dans une étude clinique de phase I chez humain.

Pour chacune des espèces animales utilisées lors des études toxicologiques, on détermine le NOAEL et on calcule la dose équivalente chez l'humain. La plupart du temps, cette dernière est estimée par rapport à la surface corporelle pour des médicaments administrés de façon systémique. D'autres avenues seront considérées pour des voies d'administration alternatives comme par exemple des formulations topiques, intranasales ou sous-cutanées. L'espèce qui génère la plus petite dose équivalente chez l'humain est l'espèce la plus sensible au médicament testé. Toutefois, on doit également considérer les différences entre les espèces en ce qui a trait à l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du médicament (ADME) ainsi que toute autre information disponible pour une même classe de médicaments qui donnerait une indication quelconque pour déterminer laquelle des espèces animales est la plus prédictive de la toxicité chez l'homme.

Finalement, afin de fournir une marge supplémentaire pour la protection des sujets humains participant à la première étude clinique, un facteur de correction additionnel pour l'innocuité est appliqué. Ce facteur additionnel permet de prendre en considération certains faits.

Premièrement qu'il est possible que l'humain soit plus sensible que les animaux testés par rapport aux effets indésirables observés chez les animaux. Deuxièmement, le fait qu'il est possible d'observer chez l'humain des signes de toxicité difficiles à détecter chez les animaux comme par exemple des maux de têtes ou des troubles mentaux. Troisièmement, il est fort possible que l'ADME du médicament diffère d'une espèce à l'autre, tout comme l'affinité et la densité des récepteurs impliqués dans la réponse au médicament. Enfin, il y a toujours une possibilité qu'une toxicité inattendue soit observée qui n'était pas prévisible avec les données toxicologiques disponibles au moment de la prise de décision. La valeur standard donnée au facteur de correction pour l'innocuité est de 10 mais peut être augmentée ou réduite selon l'ensemble des connaissances disponibles sur le médicament, sa classe et le type d'administration. Il peut être intéressant de comparer la dose initiale à donner chez l'humain obtenue par l'algorithme qui vient d'être décrit par rapport à la dose qui serait pharmacologiquement active selon les modèles pharmacodynamiques. Dans certains cas, il est possible qu'on veuille diminuer la dose initiale [50].

La méthode dite du NOAEL qui vient d'être décrite est la plus conservatrice mais présente quelques inconvénients non négligeables. La détermination du modèle animal le plus approprié peut s'avérer un processus long et coûteux et la détermination du facteur de correction pour l'innocuité est complètement arbitraire. Certains vont donc préconiser une approche par l'allométrie, méthode décrite à la section suivante [51].

2.2.2 Allométrie

L'allométrie est l'étude des effets de la variation de la taille des êtres vivants sur des processus physiologiques. L'extrapolation par allométrie (*'scale-up'*) repose sur l'hypothèse qu'il y a des similarités anatomiques, physiologiques et biochimiques entre les mammifères qui peuvent être décrites par des équations mathématiques. A l'origine, l'hypothèse était que tous les processus physiologiques sont proportionnels à la grandeur ou à la masse corporelle. C'est en 1838 que deux scientifiques français, Sarrus et Rameaux, ont postulé que les mammifères devaient produire de l'énergie à un taux proportionnel à la surface de leur corps pour maintenir

leur température interne constante. Ils ont également démontré que la surface corporelle était proportionnelle à la masse corporelle à une puissance $2/3$. Plusieurs processus physiologiques ou encore la taille de certains organes sont effectivement reliés mathématiquement à la masse corporelle par une fonction de puissance [51].

La relation mathématique à la base de l'extrapolation par allométrie est la suivante :

$$P = aM^b \quad (26)$$

où P est le paramètre pharmacocinétique à extrapoler, " a " le coefficient allométrique, M la masse corporelle et " b " l'exposant allométrique. L'allométrie offre l'avantage d'être simple et rapide. Il est cependant préférable d'avoir des données sur plusieurs espèces animales pour couvrir 2-3 ordres de grandeur si on veut une bonne prédiction. Certaines relations de base sont bien connues. Certains paramètres physiologiques comme la température corporelle et les hématocrites sont constants entre les espèces de mammifères. Le volume sanguin est directement proportionnel au poids avec $b = 1$. Le rythme cardiaque lui par contre diminue lorsque la masse augmente, avec un $b = -0.25$ alors que la masse du squelette augmente plus vite que la masse corporelle avec $b = 1.08$. Le poids du foie par exemple a un $b = 0.86$ [51-53].

L'extrapolation de certains paramètres pharmacocinétiques est par contre moins évidente. A la base, l'allométrie simple ne demande pas de connaissances approfondies des voies d'élimination d'un médicament ou encore d'une description détaillée de la liaison aux protéines ou aux globules rouges. On se contente de relier un paramètre à une fonction de puissance de la masse corporelle. Dans les débuts de l'allométrie, on utilisait systématiquement l'exposant 0.67 pour toute prédiction. Ce chiffre vient du fait qu'on supposait que l'allométrie devait être faite exclusivement sur la base de la surface corporelle qui elle même est proportionnelle à la puissance 0.67 de la masse corporelle. Dans le cas de la clairance, on retrouvait aussi l'utilisation de l'exposant 0.75 qui lui repose sur le fait que le métabolisme basal des mammifères est relié à la masse corporelle par un exposant de 0.75 [51]. Mais un paramètre tel que la clairance intrinsèque (CL_{int}) ne s'extrapole pas aussi facilement. Plusieurs facteurs de correction ont été explorés au cours des années. Il y a le produit du potentiel d'espérance de

vie maximale (MLP pour *maximum life-span potential*) dont l'idée vient du concept de néoténie. Ce principe invoque l'hypothèse que les espèces les plus évoluées vivent plus longtemps, ont une maturation plus lente, ont des cerveaux plus grands et plus complexes et ont un métabolisme oxydatif de phase I plus lent. Dans le même ordre d'idée, le poids du cerveau a également été évalué comme facteur de correction. Ces corrections n'ont cependant pas de véritables bases physiologiques et ont une portée limitée.

L'allométrie rend bien compte de processus tel que l'élimination par voie rénale. Par contre, lorsqu'un médicament est métabolisé de façon significative, cette technique semble moins appropriée étant donné les grandes différences d'une espèce à l'autre en ce qui a trait au métabolisme [54]. En effet, bien que les différentes espèces animales partagent les mêmes familles d'enzymes métabolisant les médicaments ainsi que les phénomènes de transport actif, ces processus peuvent passablement différer sur les plans qualitatifs et quantitatifs pour bien des médicaments. Les prédictions faites par l'allométrie pour des médicaments métabolisés ou transportés de façon active ne sont généralement pas très bonnes et la biodisponibilité observée chez les animaux est peu représentative de celle observée chez l'humain [55]. Certains affirment cependant qu'en utilisant au moins trois espèces animales, on neutralise en quelque sorte les différences [51]. Ce concept n'a toutefois pas de fondements physiologiques.

2.2.3 Extrapolation à l'échelle humaine de données *in vitro*

Bien que l'on retrouve souvent les mêmes familles et sous-familles d'enzymes hépatiques d'une espèce de mammifère à l'autre, les enzymes ne sont pas identiques et ne se retrouvent pas dans les mêmes proportions d'une espèce à l'autre. En ce qui concerne le métabolisme des médicaments, ces différences entre les espèces limitent la valeur prédictive des résultats expérimentaux obtenus chez les animaux lorsqu'on veut les extrapoler à l'humain. On devrait donc choisir des espèces animales dont le métabolisme ne s'éloigne pas trop du métabolisme humain pour un médicament donné lors des études de toxicologie mais ceci demeure un concept théorique car encore faudrait-il avoir une idée de ce que pourrait être le métabolisme chez l'humain à cette étape. On favorise donc de plus en plus les études *in vitro* à celles chez

les animaux. Les études de métabolisme *in vitro* peuvent être réalisées dans des microsomes hépatiques humains (fractions intracellulaires de tissu hépatique). On retrouve dans les microsomes hépatiques la plupart des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments (e.g. la superfamille du cytochrome P450 et UDP-glucuronyltransférase), ce qui permet d'obtenir des données préliminaires sur un nouveau médicament. Les microsomes ont l'avantage d'être facile à préparer, disponible sur le marché et d'être stable en cryoconservation. Toutefois, comme l'organisation cellulaire est détruite, les microsomes ne sont pas appropriés pour étudier des séquences de réactions métaboliques. Ils peuvent également ne pas être appropriés pour l'étude des interactions médicamenteuses s'il y a une différence significative entre les concentrations plasmatiques et les concentrations à l'intérieur des hépatocytes. Entre autres modèles *in vitro*, mentionnons également les modèles cellulaires comme les hépatocytes ou les coupes de foie qui ont l'avantage de conserver toutes les enzymes hépatiques et l'architecture cellulaire. Ces systèmes se conservent cependant moins bien. Les cellules Caco-2 sont quant à elles utilisées comme modèle substitut de l'intestin humain pour l'étude du transport par la P-gp. Comme autre modèle *in vitro* servant à l'étude du métabolisme des médicaments mentionnons enfin les modèles recombinants où les enzymes humaines recombinantes ont été exprimées dans des cellules présentant une faible activité intrinsèque. Ces systèmes ont l'avantage d'isoler chaque voie métabolique mais on ne peut par conséquent pas obtenir de données sur la contribution relative de chaque voie métabolique [56, 57].

Dans le contexte du développement d'un médicament, l'extrapolation de la clairance intrinsèque (CL_{int}) à partir de données *in vitro* à la situation *in vivo* est une pierre angulaire du processus d'extrapolation à l'humain. La CL_{int} agit comme constante de proportionnalité entre le taux de métabolisme d'une substance et sa concentration au site enzymatique. Le modèle *in vitro* utilisé dépend des enzymes métaboliques que l'on veut tester. On utilise souvent les microsomes hépatiques pour étudier le métabolisme par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450), enzymes qui font l'objet d'une discussion plus approfondie dans la section 2.3.2. Lorsqu'on modélise le métabolisme au niveau du foie, on assume généralement que la fraction libre du médicament dans les hépatocytes est en équilibre avec la fraction libre du médicament

dans le plasma, que la distribution dans le foie est limitée par la perfusion au foie et que les enzymes sont réparties de façon homogène dans le foie. Le modèle le plus utilisé est le « well-stirred » pour lequel on assume également que la concentration de médicament à l'intérieur du foie est homogène et égale la concentration sanguine à la sortie du foie. Pour faire l'extrapolation entre les situations *in vivo* et *in vitro*, on utilise les contenus relatifs d'enzymes vs protéines microsomales dans les deux systèmes. *In vivo* par contre, il peut arriver que les concentrations à l'intérieur des hépatocytes soient plus grandes que les concentrations plasmatiques, notamment pour des composés lipophiles, ce qui fait en sorte que la CL_{int} *in vivo* sera sous-estimée. De plus, un système comme les microsomes hépatiques ne tient pas compte des phénomènes de transport actif qui peuvent avoir lieu dans les hépatocytes. Bien que les microsomes soient largement utilisés, cela mène généralement à une sous-estimation de la clairance *in vivo*. De plus, le facteur de variabilité entre les individus (incluant le polymorphisme génétique de certaines enzymes) n'est pas pris en considération par ces méthodes. Il est certain que l'industrie pharmaceutique fait beaucoup de recherche afin d'obtenir des modèles *in vitro* qui soient les plus prédictifs possible de la situation *in vivo* mais le problème est complexe et il n'existe pas de modèle parfait. [56-60]

Les résultats *in vitro*, n'en demeurent pas moins de bons indicateurs du métabolisme des médicaments. Même si la CL_{int} n'est pas prédite de façon précise, cela nous permet néanmoins de connaître les voies métaboliques impliquées et ainsi tenter de prédire les interactions possibles avec d'autres médicaments ou avec des xénobiotiques alimentaires. Les études *in vitro* ont également pour but de déterminer si un médicament est un inhibiteur ou un inducteur potentiel de différents enzymes ou transporteurs. Ces études servent à orienter les études d'interactions qui devront être faites *in vivo* chez l'humain au cours du développement du médicament [56, 61, 62]. Les études *in vitro* offrent l'avantage non négligeable d'être plus rapides que les études *in vivo* chez les animaux et de justement ne pas avoir recours à des animaux, ce qui sauve temps, argent et ménage la sensibilité de la société envers l'utilisation des animaux en laboratoire.

2.2.4 *Modélisation à base physiologique*

Idéalement, on voudrait que la modélisation pharmacocinétique relie la dose administrée aux concentrations du composé actif au site d'action. Pour des raisons évidentes, l'échantillonnage se fait plutôt au niveau systémique (sang) ou bien au niveau de l'excrétion (urine par exemple). La relation entre la dose administrée et la concentration dans les tissus peut être complexe. La modélisation pharmacocinétique physiologique (PBPK) tente quand même de faire ce lien. Bien que le concept de modéliser la relation entre la physiologie et le devenir d'un xénobiotique remonte aussi loin que les années 1920 où un dénommé Haggard décrit l'absorption par l'inhalation de l'éther d'éthyle pour les quelques premières inhalations, les modèles physiologiques ont longtemps été très limités par la difficulté de résoudre des équations complexes. Comme pour la modélisation compartimentale, le développement de l'informatique a donné lieu à une explosion des possibilités. Cependant, la modélisation physiologique a été, et est encore, limitée par la non disponibilité de données d'ordre physiologique, que ce soit au niveau de la structure et la composition des tissus, des changements impliqués pour diverses pathologies ou encore par exemple des changements amenés avec l'âge. Des informations sur la variabilité des paramètres améliorerait aussi les modèles physiologiques [63]. Au départ, la modélisation PBPK a surtout été utilisée dans les domaines de la toxicologie, en environnement et dans la gestion du risque pour des composés comme des herbicides, des solvants ou encore des hydrocarbures. Ces composés, généralement lipophiles et volatiles, sont assez bien décrits par des modèles PBPK où la distribution est limitée par la perfusion et dans lesquels la partition sang :organe est définie par un coefficient de partage [64]. L'application de ces modèles simples à des composés de nature chimique plus variée comme on en retrouve dans le domaine pharmaceutique ne va malheureusement pas de soi. Ainsi, la modélisation PBPK n'est toujours pas très répandue dans l'industrie pharmaceutique. Cette dernière considère souvent que le développement de tels modèles demande une quantité d'information trop importante, est complexe mathématiquement et demande par conséquent trop de temps. Néanmoins, on assiste à un regain d'intérêt depuis plusieurs années pour ce type de modélisation car les méthodes

conventionnelles ne sont pas non plus infallibles et on cherche d'autres moyens de mieux prédire la pharmacocinétique chez l'homme [65-67].

Contrairement à la modélisation compartimentale dont on se sert pour analyser des profils de concentrations, la modélisation à base physiologique sert plutôt à prédire le profil de concentrations à partir de données physiologiques, indépendantes du médicament, et physicochimiques, spécifiques au médicament. Aussi, contrairement à la modélisation compartimentale dans laquelle les compartiments n'ont pas de signification physiologique directe, la modélisation PBPK représente chaque organe comme un compartiment. On peut se servir de ce type de modélisation de façon partielle pour étudier un phénomène en particulier dans un organe cible comme l'inhibition du métabolisme dans le foie [68] ou le rôle de la barrière hémato-encéphalique [69]. Mais c'est un modèle global qui est le plus souvent développé où les organes sont reliés entre eux par la circulation sanguine, tel qu'illustré à la Figure 3. Ce genre de modèle peut accommoder toutes les voies d'administration (IV, oral, sous-cutanée, intramusculaire). Ce niveau du modèle est plutôt d'ordre anatomique et physiologique et ne demande généralement qu'à connaître le flux sanguin à chacun des organes considérés et le volume de chacun des compartiments.

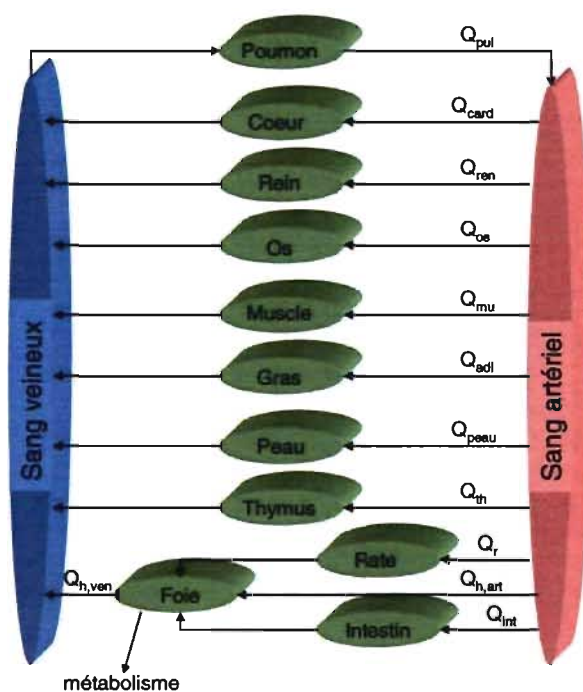
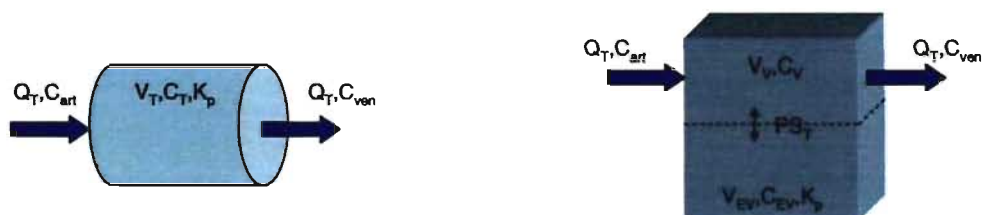


Figure 3 : Représentation schématique d'un modèle PBPK global pour un médicament éliminé par métabolisme hépatique. Les Q_i représentent les flux sanguins à chaque organe.

La distribution du médicament dans les différents organes peut ensuite se décrire de différentes façons. On divise les types de modèles de distribution en deux grandes familles : limité par la perfusion ou limité par la perméabilité. La façon la plus simple de décrire la distribution dans un tissu est le modèle où la distribution est limitée par sa perfusion. Dans ce cas, l'organe est représenté par un seul compartiment homogène dans lequel le médicament se distribue de façon instantanée (voir Figure 4). Les β -lactames qui sont en général des molécules polaires et basiques se distribuent pour la plupart davantage dans le fluide interstitiel que dans le fluide intracellulaire et sont donc en équilibre rapide avec le sang [70]. La pharmacocinétique d'une série de β -lactames a donc pu être relativement bien décrite par un modèle de distribution assez simple [71]. Le même modèle a été appliqué à la céfazoline, un médicament de la famille des céphalosporine dont la structure chimique est apparentée à celle des β -lactames [72]. À titre d'autres exemples qui fonctionnent bien de modèles limités par la perfusion, on peut citer le diazepam [73] et la doxorubicin [74].

Pour ce qui est d'un modèle où la distribution dans un tissu est limitée par la perméabilité tissulaire, on peut avoir un modèle aussi complexe que l'on veut mais la modélisation est toujours limitée ultimement par le type et la qualité des données disponibles. La Figure 4 (page suivante) montre également un exemple simple d'un modèle limité par la perméabilité. Il existe toutefois bien d'autres modèles et de façons de paramétrer la distribution limitée par la perméabilité. De plus, pour un même médicament, la distribution n'est pas nécessairement décrite par le même modèle pour tous les organes. Par exemple, le fentanyl et l'alfentanil ont une distribution tissulaire décrite par un modèle limité par la perfusion pour des organes tels le cœur et le cerveau alors qu'on a décrit leur distribution dans d'autres organes par des modèles à deux et trois compartiments limités par la perméabilité et paramétrés en terme de clairance de distribution [75, 76]. Pour ne citer que quelques exemples, la terbinafine est également mieux décrite par un modèle mixte [77], ainsi que l'estradiol [78], la primidone et ses deux métabolites [79] et le thiopental [80].



Distribution limitée par la perfusion Q_T

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{Q_T}{V_T} \cdot C_{art} - \frac{Q_T}{V_T \cdot K_p} \cdot C_T$$

Distribution limitée par la perméabilité PS_T

$$\frac{dC_v}{dt} = \frac{Q_T}{V_v} \cdot C_{art} + \frac{PS_T}{V_v \cdot K_p} \cdot C_{ev} - \frac{(Q_T - PS_T)}{V_v} \cdot C_v$$

$$\frac{dC_{ev}}{dt} = \frac{PS_T}{V_{ev} \cdot K_p} \cdot (C_v - C_{ev})$$

Figure 4: Schéma et équations décrivant une distribution tissulaire limitée par la perfusion ou la perméabilité. Q = flux sanguin, C = concentration, V = volume, K_p = constante de partage, PS = coefficient de perméabilité, T = tissus, ART = artériel, VEN = veineux, V = vasculaire, EV = extravasculaire.

Lorsqu'il s'agit d'étudier la modélisation pour un médicament ou une problématique en particulier, on peut se permettre d'explorer le potentiel prédictif de plusieurs modèles. Toutefois, il est important de mentionner qu'à l'étape de la découverte d'un médicament, dans un contexte où on évalue des dizaines de molécules, des modèles plus généraux sont favorisés. Quelques modèles PBPK génériques développés pour le rat et l'humain ont été évalués pour des séries de composés. On utilise le terme de « modèle générique » pour des modèles qui ne requièrent pas de données animales et qui reposent essentiellement sur les propriétés physicochimiques des médicaments étudiés ainsi que la CL_{int} hépatique déterminée *in vitro*. Les paramètres

physicochimiques spécifiques aux médicaments sont principalement le coefficient de partition octanol :eau (ou encore huile d'olive :eau), la constante d'ionisation (pK_a), la fraction libre du médicament dans le plasma ($f_{u,p}$) et le ratio sang :plasma. On suppose que la distribution dans chaque organe est limitée par le flux sanguin et que la concentration de médicament à l'intérieur de chaque organe est homogène. Le coefficient de partition pour chaque organe est fonction des fractions volumiques d'eau, de lipides neutres et de phospholipides typiques de chaque organe. Ces modèles sont utiles lorsqu'il s'agit de faire une prédiction rapide du profil des concentrations à l'équilibre. Ces modèles peuvent donc être utilisés assez tôt dans le processus de développement d'un médicament pour faire une évaluation préliminaire de la pharmacocinétique. Cependant, comme ils négligent le métabolisme extrahépatique, les phénomènes de transport et ne considèrent pas non plus la possibilité que la distribution à l'intérieur des organes soit limitée par la diffusion plutôt que par la perfusion, il sera souvent préférable d'envisager des modèles plus complexes et plus spécifiques à un médicament donné afin d'obtenir de meilleures prédictions [67, 81-83].

Il peut être plus pratique d'utiliser un modèle plus général s'il s'agit de développer un modèle pour des populations spécifiques. C'est le cas du modèle développé pour le midazolam chez des patients en chirurgie pour lesquels la modélisation a surtout mis l'accent sur les conséquences de l'infusion de fluides dans la phase pré-opératoire, de la perte de sang ainsi que des fluides de remplacement dans le changement du volume de distribution à l'équilibre. Ces changements sont principalement attribués à une diminution des concentrations d'albumine [84]. La modélisation PBPK peut également servir à prédire la pharmacocinétique dans des populations vulnérables comme la population pédiatrique par exemple [85].

L'absorption intestinale d'un médicament est probablement la partie la plus complexe à modéliser. Idéalement on doit pouvoir tenir compte de la variation du pH dans le tractus gastro-intestinal, de la dissolution du médicament dans un médium représentant le plus possible les fluides intestinaux, de la perméabilité de la paroi intestinale au médicament, de la présence de transports actifs et d'un métabolisme du médicament au niveau des entérocytes, ainsi que de différents paramètres physiologiques de l'intestin comme le temps de transit dans l'intestin et la

surface d'absorption, autant de facteurs qui détermineront ultimement la fraction absorbée (F_A), celle absorbée et non métabolisée (F_G) qui se retrouvera dans la veine porte pour passer au foie. Évidemment, il est impossible de connaître tous les paramètres de façon précise et on doit bien entendu faire des approximations au meilleur des connaissances actuelles. L'intégration dans un seul et même modèle de toutes les considérations physicochimiques, biochimiques et physiologiques que nous venons d'énumérer est relativement récente. Il existe déjà au moins un logiciel (GastroPlus®) permettant de prédire la biodisponibilité, principalement à partir de données *in vitro* [86-88]. Pour des raisons de propriété intellectuelle, le modèle et l'estimation des différents paramètres physiologiques et physicochimiques ne sont pas complètement disponibles dans la littérature, ce qui limite l'appréciation que l'on peut en faire. De ce que l'on sait, les paramètres liés au transport par la glycoprotéine-P (P-gp ou ABCB1) ne sont pas calculés au préalable mais seulement estimés à partir de données réelles [86]. Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la question de l'interaction entre le transport et le métabolisme intestinal. D'un point de vue théorique, on peut facilement décrire ces processus par des équations différentielles. Ce qui rend difficile par contre l'application de ces modèles est l'estimation des paramètres nécessaires aux calculs, principalement des paramètres physiologiques. À ce jour par exemple, il est encore difficile de dire avec précision combien d'enzymes métaboliques et de transport peuvent se retrouver dans le petit intestin. Il est donc difficile de traduire *in vivo* ce que nous observons *in vitro*. La question n'en demeure pas moins importante. [89-92]

Outre les modèles d'absorption globale, d'autres concepts basés sur l'estimation d'un seul paramètre et permettant de prédire si une molécule sera bien absorbée ou non sont utilisés. Par exemple, on peut utiliser la F_A trouvée chez le rat pour prédire celle chez l'humain. La corrélation est relativement bonne pour des composés minimalement métabolisés au niveau de l'intestin et pour lesquels il n'y a pas de transport actif. La portée de cette méthode est donc limitée à des composés qui ne présentent pas de problème d'absorption [93, 94]. La méthode *in vitro* la plus connue est probablement la détermination de la perméabilité avec des cultures de cellules Caco-2 [95-100]. Ces cellules provenant du colon ont comme caractéristiques

intéressantes de pouvoir se développer en monocouches et de présenter une membrane en brosse du côté apical, tout comme les entérocytes. De plus, les cellules Caco-2 expriment les mêmes transporteurs retrouvés dans l'intestin, bien qu'ils le soient en proportions différentes. On retrouve donc dans les cellules Caco-2 non seulement la P-gp mais aussi les protéines de transport telles MRP2, MRP3, BCRP, PEPT1, MCT1, OATPB, OCT1 et OCTN2. L'expression de la P-gp dans les cellules Caco-2 est relativement représentative de celle du petit intestin chez l'humain, ce qui en fait un bon modèle *in vitro* pour le transport intestinal. D'autres protéines comme MRP2, BCRP et OATPB diffèrent par contre en quantité par des facteurs d'au moins 5 par rapport au tissu intestinal [101-104]. Notons également que l'expression de la P-gp tend à augmenter du duodenum jusqu'à l'illéum distal et les cellules Caco-2 pourraient être plus représentatives du petit intestin proximal [104]. La corrélation entre la perméabilité déterminée à partir des cellules Caco-2 et F_A fonctionne bien pour des F_A élevées mais beaucoup moins bien dans les autres cas [66, 94, 99]. Comme il est présenté au Chapitre 5, il est cependant possible d'utiliser autrement les données obtenues par les expériences menées avec ces cellules.

Quelques études ont établi la performance relative de différentes techniques d'extrapolation à partir de données *in vitro* ou animales pour des paramètres spécifiques comme la clairance hépatique [59, 105-109], le volume de distribution [106, 110-114] ou la biodisponibilité [86, 94, 106, 115]. Cependant, on trouve seulement deux publications portant sur les performances relatives de l'allométrie par rapport à la modélisation PBPK en ce qui a trait à la prédiction de la pharmacocinétique globale chez l'humain [116, 117]. En plus d'avoir comparé différentes méthodes d'analyse compartimentale de population, nous avons voulu comparer les performances relatives de l'allométrie par rapport à la modélisation PBPK dans la prédiction de la pharmacocinétique chez l'humain pour le cas spécifique de la cyclosporine. Bien que la section suivante discute en détail les caractéristiques de la cyclosporine, mentionnons tout de même que la cyclosporine est presque entièrement éliminée par métabolisme, hépatique et intestinal, et est un substrat du transporteur P-gp. L'absorption de la cyclosporine est par conséquent très variable et les prédictions faites par allométrie sont plutôt mauvaises. Dans le

domaine de la prédiction pharmacocinétique, on considère généralement qu'une prédiction est mauvaise si elle diffère par un facteur plus grand que deux par rapport aux valeurs observées. Plusieurs modèles PBPK ont déjà été proposés pour la cyclosporine administrée de façon intraveineuse [118-122] mais aucun pour la modélisation de son absorption au niveau intestinal. La modélisation PBPK de la distribution de la cyclosporine est inspirée d'un modèle précédemment publié dans la littérature [119]. Nous avons ajouté à ce modèle un modèle d'absorption PBPK pour la cyclosporine administrée de façon orale qui inclut à la fois le transport par la P-gp et le métabolisme intestinal par CYP3A, entièrement estimés à partir de données *in vitro*. Ce modèle nous a permis d'estimer la biodisponibilité de la cyclosporine. Cette nouvelle partie du modèle permet également d'ajouter le métabolisme extrahépatique à partir de la circulation systémique. De plus, nous présentons une nouvelle façon d'analyser et d'utiliser les résultats des études de perméabilité sur des cellules Caco-2. Le modèle PBPK d'absorption ainsi que la comparaison avec l'allométrie sont présentés au chapitre 5.

2.3 Cyclosporine et interactions médicamenteuses

2.3.1 Cyclosporine

La cyclosporine a servi de médicament modèle pour l'étude comparative entre la modélisation physiologique et l'allométrie. Afin de valider l'application de l'allométrie et de la modélisation à base physiologique, il était essentiel d'avoir accès à des données pharmacocinétiques de cyclosporine chez l'humain. Une étude dans laquelle 12 volontaires sains ont reçu de la cyclosporine oralement a été réalisée à cette fin. Pour rendre l'étude plus intéressante d'un point de vue clinique, l'étude s'est faite sous la forme d'une étude d'interaction entre la cyclosporine et des jus de pamplemousse et de canneberges. La cyclosporine est un médicament avec un index thérapeutique étroit. Une interaction médicamenteuse impliquant la cyclosporine peut avoir des conséquences graves et il est important d'explorer le potentiel d'interaction de tout médicament ou aliment ayant le potentiel d'interagir avec les enzymes impliquées dans le métabolisme et le transport de la cyclosporine. Le pamplemousse a été choisi parce qu'il contient des furanocoumarins impliqués dans l'interaction du jus de pamplemousse avec la

cyclosporine. Le jus de canneberges a quant à lui été choisi pour sa très grande popularité et l'importance d'établir s'il peut avoir un effet sur la pharmacocinétique de la cyclosporine. De plus amples détails sur les aspects qui ont motivé le choix des jus de pomelo et de canneberges sont donnés dans le chapitre 4 portant essentiellement sur cette étude d'interaction.

La cyclosporine est un polypeptide cyclique liposoluble de 11 acides aminés utilisé comme agent immunosupresseur [123]. La cyclosporine est principalement indiquée pour la prévention du rejet de greffon suite à une transplantation de rein, de foie et de cœur. On l'utilise aussi pour la prévention de la réaction greffon-vs-hôte à la suite d'une greffe de moelle osseuse. La cyclosporine est également indiquée dans le traitement de cas graves de psoriasis ou de polyarthrite rhumatoïde [124].

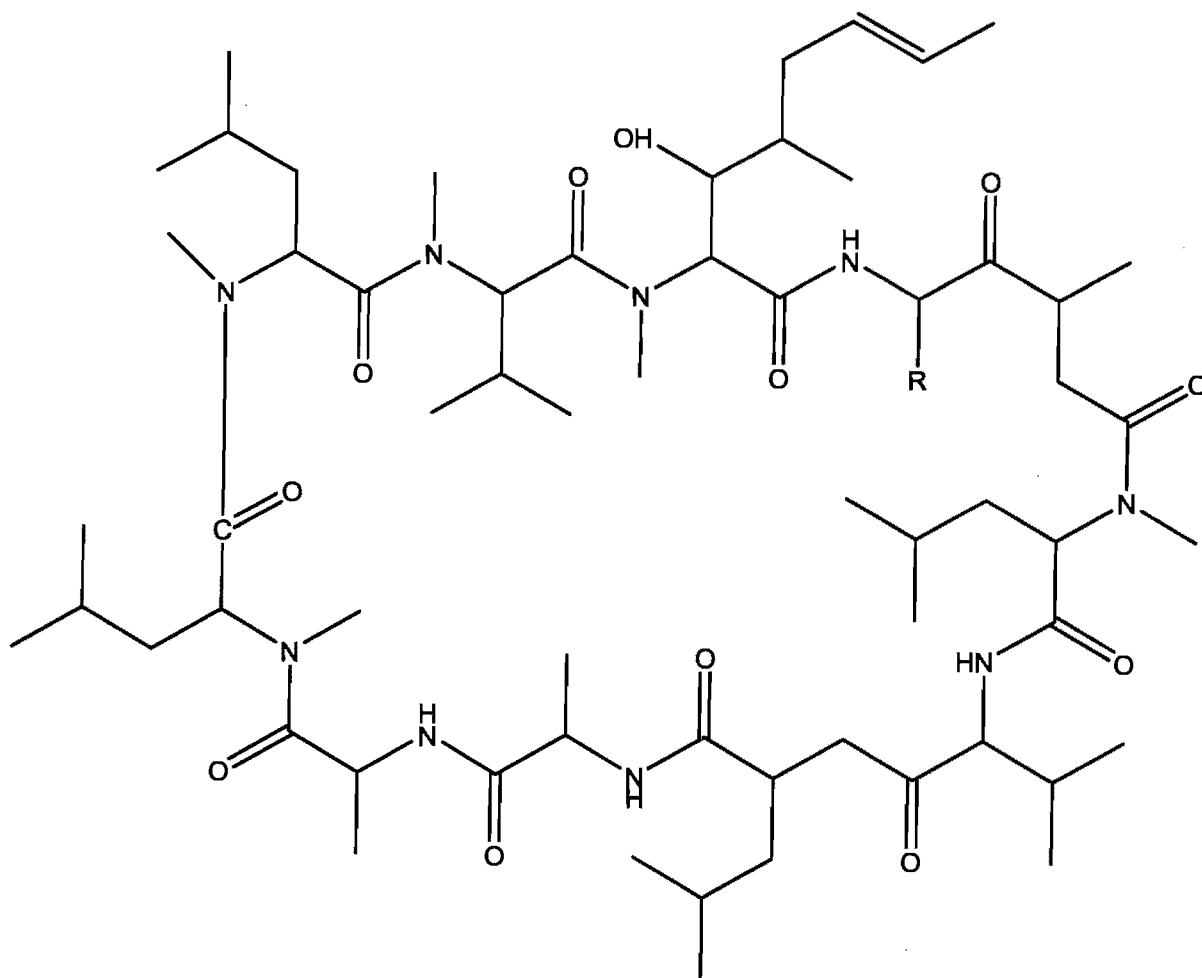


Figure 5: Structure chimique de la cyclosporine. R = O-Ala

La cyclosporine inhibe surtout les réactions immunitaires à médiation cellulaire. Le mécanisme d'action de la cyclosporine n'est pas complètement élucidé mais on sait néanmoins qu'elle agit au niveau du système immunitaire acquis en inhibant les cellules T. La cyclosporine inhibe de façon sélective et réversible la production des lymphokines, dont l'interleukine-2, par les lymphocytes T auxiliaires en formant un complexe avec la cyclophiline. La cyclophiline est un récepteur cytosolique impliqué dans la voie de signalisation cellulaire nécessaire à la production de lymphokines. L'interleukine-2 induit entre autres la division cellulaire des autres types de lymphocytes T, comme les T cytotoxiques, qui vont poursuivre la réaction immunitaire. Lorsqu'on fait une greffe d'organe, ce sont principalement les lymphocytes T cytotoxiques qui vont réagir fortement pour détruire tout tissu étranger à l'organisme. La cyclosporine n'affecte cependant pas la production d'anticorps par les lymphocytes déjà sensibilisés et permet donc de conserver l'immunité déjà acquise avant le traitement [125-127].

La cyclosporine n'est pas complètement absorbée suivant une administration orale et l'absorption varie grandement d'un individu à l'autre. Avec la formulation originale, Sandimmune®, l'absorption varierait en fonction de la population de patients, de la dose, de l'état des fonctions gastro-intestinale et hépatique, de l'excrétion biliaire et de la prise de nourriture. Par contre, la formulation de Neoral®, une formulation modifiée présentant la cyclosporine dispersée dans une microémulsion, est mieux absorbée, semble moins influencée par certains des facteurs mentionnés précédemment et présente moins de variabilité intraindividuelle. Dans le sang, la cyclosporine se lie principalement aux érythrocytes et aux lipoprotéines et le taux de liaison est dépendant de la température et de la concentration. Il est donc généralement recommandé de mesurer la cyclosporine dans le sang plutôt que dans le plasma [128, 129]. La cyclosporine est principalement métabolisée par le CYP3A et est également un substrat du transporteur transmembranaire P-gp, ce qui contribue également à la grande variabilité inter individuelle de la cyclosporine [130, 131]. L'élimination se fait surtout par voie biliaire et environ 6% seulement de la dose se retrouve dans l'urine. Moins de 1% se retrouve sous la forme inchangée. Plus de 30 métabolites de la cyclosporine ont été identifiés

mais leur contribution à l'activité biologique et à la toxicité du médicament est minime comparativement au composé mère [124, 132].

La cyclosporine est un médicament avec un index thérapeutique étroit qui nécessite un suivi médical régulier afin de s'assurer que les patients ont des concentrations sanguines de cyclosporine adéquates. Des concentrations sous thérapeutiques entraînent un rejet de la greffe alors que des concentrations trop élevées seront toxiques. Un des plus fréquents et des plus importants effets indésirables observés suite à l'administration de la cyclosporine suivant une transplantation est la néphrotoxicité. L'hypertension est également observée assez fréquemment ainsi que des tremblements et l'apparition d'hirsutisme [126].

2.3.2 *Cytochrome P450*

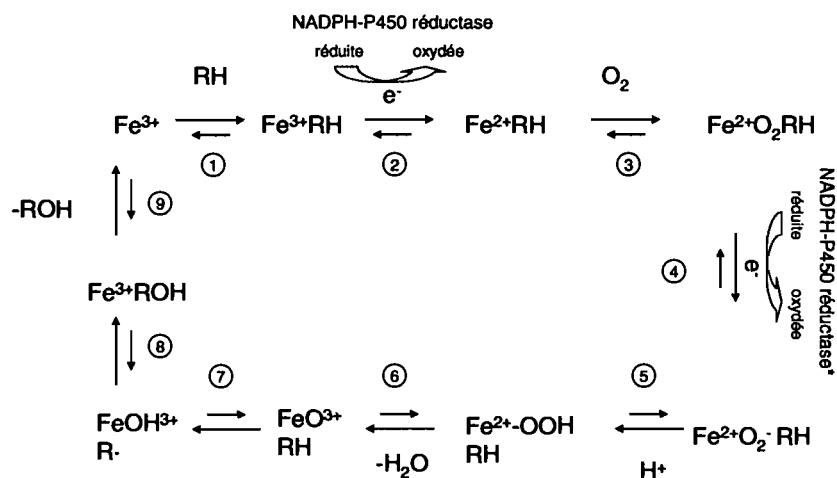
Le cytochrome P450 est un terme désignant une super famille d'enzymes et qui tire son nom du fait que le maximum d'absorption de ces protéines dans le spectre UV-visible se situe à 450 nm lorsqu'elles sont liées au CO. La nomenclature internationale de ces enzymes est basée sur la similarité dans les séquences d'acides aminés. On désigne par l'abréviation CYP une isoenzyme du cytochrome P450. Les enzymes sont regroupées en famille avec >40% d'homologie à l'intérieur de chaque famille, désignée par un nombre arabe (1,2,3...). Chaque famille est divisée en sous-famille avec >55% d'homologie à l'intérieur de chaque sous-famille, désignée par une lettre (A,B,C,...). Chaque enzyme est ensuite identifiée individuellement par un autre chiffre arabe (1,2,3,...) [57]. Ces enzymes se retrouvent dans à peu près tous les organismes vivants. Les protéines sont arrangées en une série d'hélices α et de replis. Tous ces enzymes ont en commun un atome de fer au centre d'un hème lié à la protéine par l'atome de soufre d'un groupement cystéine situé entre les hélices I et L. La structure de l'hélice I est d'ailleurs particulièrement bien conservée d'un enzyme à l'autre du fait qu'elle contient ce groupement cystéine. Ces enzymes sont situés dans le réticulum endoplasmique des cellules dans lequel elles se fixent par une hélice hydrophobe au N-terminal [133, 134].

Avec le séquençage du génome humain, on dénombre 57 enzymes de cette famille chez l'humain. Certains de ces enzymes sont très spécifiques et sont impliqués dans des fonctions endogènes comme la synthèse de stéroïdes et le métabolisme des lipides alors que d'autres ont une fonctionnalité plus générale et sont impliqués dans le métabolisme (principalement oxydatif mais aussi réducteur) de substances exogènes telles que des médicaments. Ce sont surtout les enzymes des familles 1,2 et 3 qui sont impliquées dans le métabolisme des médicaments. Plus spécifiquement, on considère les isoformes 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 et 3A7 [134, 135]. La majorité des enzymes du CYP sont situés dans le foie. Les deux sous-familles de CYP principalement retrouvées dans le foie sont CYP3A et CYP2C, qui représentent respectivement 50% et 18% des CYP hépatiques. On y retrouve également les 1A, 2B, 2D et 2E [136]. Au niveau de l'intestin, on retrouve surtout les enzymes du CYP3A mais aussi en plus petite quantité du CYP2C, enzymes que l'on retrouve principalement dans les entérocytes du petit intestin [137-139]. Le métabolisme au niveau du foie et de l'intestin constitue une barrière majeure à la biodisponibilité des médicaments pris de façon orale [133, 134]. Comme il a été mentionné précédemment, la cyclosporine est un substrat des CYP3A. Cette sous-famille d'enzymes est probablement la plus importante dans le métabolisme des composés exogènes et métabolise jusqu'à 60% des médicaments utilisés de nos jours. Elle représente 30 à 50% des CYP hépatiques [135] et la grande majorité des CYP intestinaux [138, 139]. Bien que l'abondance des CYP3A au niveau du petit intestin ne représente que moins de 1% des CYP3A hépatiques, leur emplacement en fait un facteur important à considérer dans la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale [140-142]. Le jejunum est la partie de l'intestin où l'on retrouve la plus grande quantité de CYP3A [140, 142].

On retrouve des CYP aussi dans d'autres organes comme le cerveau où on retrouve à la barrière hémato-encéphalique principalement les enzymes CYP1B1 mais aussi CYP2D6 et CYP2E1 [143]. Fait intéressant, les métaboliseurs lents du CYP2D6 sont plus à risque de développer la maladie de Parkinson [144]. On retrouve également différents CYP au niveau du sein, dont le CYP2D6 qui est exprimé différemment dans les tissus sains et dans les tumeurs [145]. Beaucoup de CYP sont exprimés dans les poumons et le tractus respiratoire mais à des

niveaux beaucoup plus bas que dans le foie. On y retrouve entre autre les CYP1A1, 1A2, 2B6, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5 [146]. Les reins contiennent environ 6 fois moins de CYP/mg de protéines que le foie et le métabolisme rénal est en général moins bien caractérisé que celui hépatique. On sait néanmoins que les CYP3A4, 3A5 et 2B6 y sont présents, ainsi que 1A1 et 1A2 [147].

La Figure 6 présente un schéma général possible du cycle catalytique d'un enzyme du P450 [133]. Le substrat (RH) commence par se lier dans la région de l'hème. Le fer qui au départ est ferrique (Fe^{3+}) est réduit à l'état ferreux (Fe^{2+}) par un transfert d'électron provenant de la NADPH-P450 réductase à l'étape 2. Un atome d'oxygène forme ensuite un complexe avec Fe^{2+} -RH et ce complexe peut être réduit (étape 4) par un électron provenant d'une NADPH-P450 réductase ou encore du cytochrome b5. Un proton est ensuite ajouté à ce complexe (étape 5), ce qui va permettre le clivage du lien O-O. Par le retrait d'une molécule d'eau à l'étape 6, on se retrouve avec un complexe réactif à partir duquel on peut rationaliser la plupart des réactions observées avec le P450. Celle représentée sur la Figure 6 en est une d'oxydation. Les réactions les plus communes dans le métabolisme des médicaments sont probablement l'hydroxylation d'un atome de carbone ou d'hétéroatomes comme l'azote et le soufre ou une déalkylation, soit le relâchement d'un groupement alkyl sur un hétéroatome.



*Le transfert d'électron peut se faire également par le biais de b₅

Figure 6 : Schéma général du cycle catalytique du P450 [133] Fe = atome de fer de l'hème; RH = substrat; ROH = produit de la réaction

D'autres voies métaboliques existent, telles les réactions dites de phase II qui sont des réactions de conjugaison avec des groupements glucuronidés, sulfatés ou avec le glutathion, l'acétate ou la glycine. Cependant, nous nous contenterons de décrire ici le métabolisme par les enzymes du CYP450.

2.3.3 P-glycoprotéine

La P-gp est un transporteur parmi beaucoup d'autres mais c'est probablement l'un des mieux caractérisés, du moins en ce qui a trait au transport des médicaments. C'est le transporteur principal qui nous intéresse dans le cadre de ce travail car la cyclosporine en est un substrat [101]. La P-gp fait partie de la famille des transporteurs ABC (pour ATP-Binding-Cassette) qui sont des transporteurs transmembranaires dépendant de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). L'unité fonctionnelle contient deux domaines transmembranaires qui formeraient un pore permettant aux molécules de traverser la membrane cellulaire. On connaît aussi la P-

gp par le nom de ABCB1 (qui désigne la protéine et le gène) ou celui de MDR1 désignant gène correspondant. Parmi les autres transporteurs intestinaux on retrouve d'autres membres de la famille des transporteurs ABC (BCRP, MRP2, MRP3) ainsi que des transporteur de la famille SLC (Solute Carrier) (PEPT1, MCT1, OATPB, OCTN2, CT1) [101, 148]. La Figure 7 à la page suivante donne un aperçu des protéines de transport retrouvées chez l'humain.

La P-gp est généralement exprimée dans l'épithélium où elle sert de barrière à l'absorption ou à des sites d'excrétion. On retrouve la P-gp sur la surface apicale des tubules rénaux où elle contribue à la sécrétion de la digoxine par exemple. L'excrétion de médicaments lipophiles et de leurs métabolites dans les canaux biliaires est également médiée en partie par la P-gp. On en retrouve tout au long de l'intestin, davantage au niveau du jejunum et de l'ileum, où ce transporteur prend une grande importance comme barrière à l'absorption des médicaments pris oralement, de concert avec les enzymes CYP3A. Enfin ce transporteur est une composante importante de la barrière hémato-encéphalique et agit comme barrière au niveau des capillaires endothéliaux du cerveau, limitant ainsi la distribution des médicaments du sang vers le système nerveux central. La P-gp ainsi que d'autres protéines de transport de la famille ABC est surexprimée dans certaines cellules cancéreuses et contribue grandement aux mécanismes de résistance multiples des médicaments anticancéreux [123, 143, 148-150].

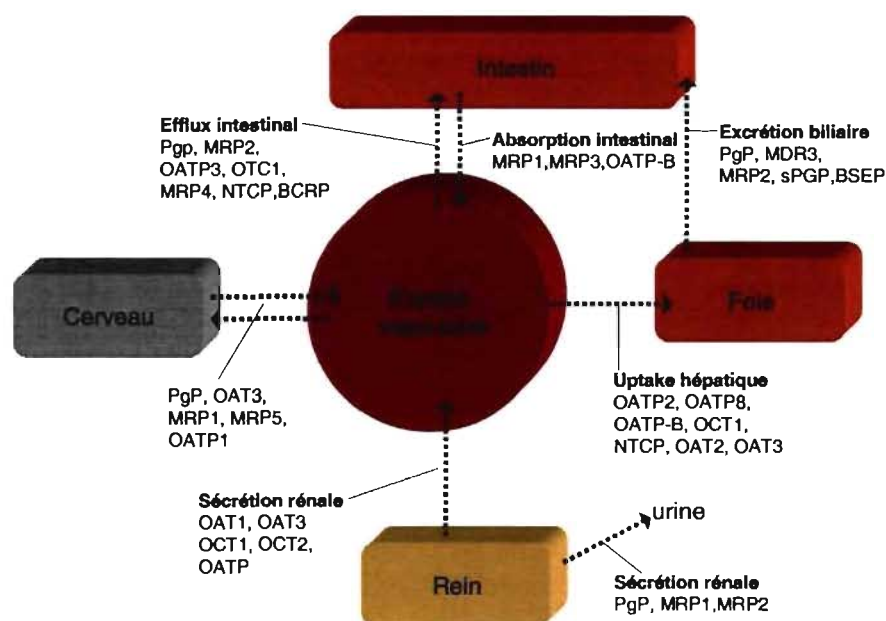


Figure 7 : Localisation dans les tissus et rôle des protéines de transport dans la disposition des médicaments.[151-153]

2.3.4 Interactions avec les médicaments : métabolisme et transport

D'un point de vue cinétique, les interactions médicamenteuses peuvent avoir lieu à toutes les étapes du devenir d'un médicament. Les interactions peuvent affecter l'absorption, la biodisponibilité, la liaison aux protéines, la distribution, le métabolisme et l'élimination des médicaments. Les médicaments peuvent interagir entre eux au niveau des transporteurs membranaires ou des enzymes responsables de leur métabolisme, soit par interaction directe sur l'enzyme ou par une modulation de son expression. Les médicaments peuvent aussi interagir directement entre eux, par exemple par chélation. Les mécanismes d'interaction sont compétitifs ou non compétitifs et peuvent être réversibles ou irréversibles. Enfin, une interaction pourra résulter en une inhibition ou en une induction d'un processus [150, 154].

Faisons d'abord la distinction entre une interaction compétitive et non compétitive. Pour qu'une interaction soit dite compétitive il doit d'abord y avoir un site de compétition. Ce site peut être une protéine à laquelle se lie les médicaments, un transporteur ou encore un enzyme

métabolisant les médicaments. Les deux médicaments doivent se lier au même site pour qu'il y ait ce type d'interaction. La résultante de cette interaction compétitive dépend de l'affinité relative des deux médicaments pour le site de liaison ou de réaction et de leurs concentrations respectives. Par opposition à une interaction compétitive, une interaction non compétitive est une interaction qui a lieu entre deux molécules qui ne concurrencent pas pour un même site.

2.3.4.1 Mécanismes d'inhibition réversible

Les interactions médicamenteuses les plus fréquemment étudiées sont sans contredit celles ayant lieu au niveau du métabolisme des médicaments. Celles avec les enzymes CYP sont les plus documentées. Les interactions métaboliques peuvent être dues à l'induction ou l'inhibition des enzymes et ce par différents mécanismes. L'inhibition d'une voie métabolique d'un médicament a pour conséquence la diminution de la quantité de métabolites formés par cette voie. Si c'est le médicament parent qui est actif mais pas le métabolite, on aura alors une augmentation de l'effet du médicament. Si par contre il s'agit d'un pro-médicament, on aura alors une perte d'efficacité. Le même raisonnement s'applique en ce qui a trait à la toxicité du médicament.

Un mécanisme classique d'inhibition du métabolisme est l'inhibition réversible compétitive résultant de la compétition entre deux médicaments pour un même site de liaison à l'enzyme. Ce type d'inhibition ne dure que le temps où le médicament inhibiteur est présent et peut avoir lieu dès que l'on a deux médicaments qui sont substrats pour le même enzyme. La compétition se fait au niveau de la première étape du cycle catalytique du cytochrome P450, soit la liaison du substrat au Fe^{3+} . Les affinités et les concentrations relatives des deux médicaments vont déterminer lequel des deux agira à titre d'inhibiteur [155]. À concentration égale, le médicament avec la plus grande affinité va se lier davantage à l'enzyme et inhibera ainsi le métabolisme du médicament avec l'affinité la plus petite. Ce dernier pourrait par contre devenir l'inhibiteur s'il est présent en quantité suffisante pour déplacer du site de liaison le médicament avec la plus grande affinité. Par ailleurs, la lipophilicité d'un composé semble être un facteur moléculaire important du pouvoir inhibiteur pour les enzymes du CYP450. Sauf pour le CYP2E1, ce pouvoir

inhibiteur augmente de façon linéaire avec la lipophilicité [156]. On peut traduire cette observation en disant que la lipophilicité d'un composé augmente son affinité pour un enzyme, et donc son pouvoir inhibiteur. Une inhibition compétitive est également caractérisée *in vitro* par le fait que l'on retrouve la même vitesse maximale de métabolisme (V_{max}) mais à des concentrations différentes. En d'autres termes, si on augmente suffisamment les concentrations du médicament inhibé, on finira par déplacer totalement l'inhibiteur du site de réaction [157]. Bien que peu commune, on peut également avoir une inhibition réversible non compétitive si les deux substrats ne se lient pas au même site sur l'enzyme et que l'inhibiteur n'affecte pas la liaison du substrat à l'enzyme. Le complexe enzyme-substrat-inhibiteur est toutefois catalytiquement non-fonctionnel [157]. Un des rares exemples de ce type d'inhibition est celui du *trans*-resvératrol qui inhibe de façon non compétitive et réversible les CYP3A4 et CYP3A5 [158].

On pourrait également penser comme exemple d'interaction compétitive à celui au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques. Toutefois, ce type d'interaction s'observe facilement *in vitro* mais a rarement des conséquences cliniques.[154] L'albumine qui se lie surtout aux médicaments acides, est présente à environ 0.6 mM dans le plasma, ce qui excède les concentrations retrouvées pour la plupart des médicaments. L'acide salicylique et l'acide valproïque sont toutefois considérés comme des compétiteurs potentiels pour les médicaments liés à l'albumine. La α_1 -glycoprotéine est présente en quantité plus faible que l'albumine dans le plasma (9-23 μ M). On pourrait donc penser qu'il serait plus fréquent d'observer des interactions au niveau de la liaison des médicaments. Des exemples d'interactions *in vivo* significatives sont cependant difficiles à trouver [6]. De plus, pour que les changements dans la liaison d'un médicament aient un impact clinique significatif, il faut d'abord que ce médicament soit fortement lié au départ.

2.3.4.2 Mécanismes d'inhibition irréversible

On observe également avec les enzymes CYP des mécanismes quasi-irréversible et irréversible. Un mécanisme quasi-irréversible est caractérisé par la formation d'un métabolite qui se lie très fortement à l'enzyme, souvent une liaison covalente avec l'hème de la protéine,

pour former un complexe stable. Ce complexe peut être dissocié dans des conditions *in vitro* mais est à toutes fins pratiques irréversible *in vivo*. L'inhibition du CYP3A4 par érythromycine a lieu par ce mécanisme [155, 157]. Il peut arriver aussi que le substrat se lie à l'enzyme et que ce complexe s'active pour initier une réaction catalytique qui amène à la formation d'un métabolite intermédiaire qui va se lier si fortement à l'enzyme qu'il va la rendre inactive. Ce type d'inhibition irréversible est appelée mécanisme suicide ou encore on peut voir le terme 'mechanism-based' car il requiert l'activation du substrat par l'enzyme [155, 159]. Les caractéristiques générales d'un tel mécanisme irréversible sont : une dépendance envers le temps d'incubation; dépendance envers la concentration d'inhibiteur; dépendance envers la présence de nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) pendant la préincubation [159].

Notons qu'on pourrait également penser qu'une interaction médicamenteuse d'inhibition pourrait être le résultat de la suppression de la synthèse des enzymes. On sait qu'il existe des éléments de régulation négative de la transcription des gènes du *CYP450* [160, 161] et de la P-gp [162]. On sait également qu'il y a régulation négative des CYP entre autres lors d'une réaction d'inflammation [160, 161] ou dans un état d'hypoxie [163]. Cependant, des exemples de médicaments causant une telle inhibition sont à toutes fins pratiques inexistant à ce jour.

2.3.4.3 Interactions au niveau des transporteurs

Les interactions médicamenteuses peuvent également avoir lieu au niveau des transporteurs tels la P-gp. L'effet d'une interaction sur un transporteur va dépendre de l'endroit où se situe le transporteur et de sa fonction. La P-gp est exprimée dans les constituants membranaires de la plupart des sites faisant office de barrière entre le sang et un organe chez l'humain. Comme le rôle de la P-gp est généralement de limiter l'exposition à un substrat en diminuant son absorption ou en favorisant son élimination, l'induction de la P-gp résultera en une diminution des concentrations plasmatiques alors que son inhibition résultera en une augmentation des concentrations du substrat [149, 150]. Il faut cependant noter que la P-gp et le CYP3A partagent la plupart du temps les mêmes substrats, inhibiteurs et inducteurs. Le

résultat des interactions observées avec la P-gp est souvent un effet combiné avec une interaction au niveau du CYP3A [164]. La présence de P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique prend une importance particulière dans le traitement du VIH. En effet, tous les inhibiteurs de protéase du VIH (saquinavir, ritonavir, indinavir...) sont des substrats de la P-gp et leur efficacité thérapeutique au niveau du cerveau est limitée [165]. La P-gp est d'intérêt notamment dans le traitement du cancer car les cellules cancéreuses surexpriment la P-gp et expulsent les médicaments anti-cancéreux hors de la cellule, réduisant ainsi l'efficacité du médicament. Beaucoup de recherche se fait donc afin de trouver des inhibiteurs de la P-gp qui pourrait être utilisés en clinique mais il semble difficile de trouver des candidats suffisamment puissants avec un profil de toxicité raisonnable [148, 150].

2.4 Références

1. Bhattaram VA et al. Impact of pharmacometric reviews on new drug approval and labeling decisions--a survey of 31 new drug applications submitted between 2005 and 2006. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(2):213-21
2. Bhattaram VA et al. Impact of pharmacometrics on drug approval and labeling decisions: a survey of 42 new drug applications. *AAPS J* 2005; 7(3):E503-12
3. Lalonde RL et al. Model-based drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82(1):21-32
4. Foster DM: Noncompartmental vs compartmental approaches to pharmacokinetic analysis dans *Principles of clinical pharmacology*, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001:75-92
5. Purves RD. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J Pharmacokinet Biopharm* 1992; 20(3):211-26
6. Rowland M, Tozer TN: *Clinical Pharmacokinetics: concepts and applications*. 3e édition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1995
7. Weiss M. The relevance of residence time theory to pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43(6):571-9
8. Gibaldi M, Perrier D: *Pharmacokinetics*. Revised and expanded second edition. New York: Informa Healthcare; 2007
9. D'Argenio DZ, Schumitzky A. A program package for simulation and parameter estimation in pharmacokinetic systems. *Comput Programs Biomed* 1979; 9(2):115-34
10. D'Argenio DZ, Schumitzky A: *ADAPT II: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software User's Guide to Release 4*. Los Angeles: University of Southern California; 1997
11. Akaike H. A bayesian extension of the minimum AIC procedure of autoregressive model fitting. *Biometrika* 1979; 66(2):237-42

12. Bozdogan H. Model selection and Akaike's information criterion (AIC): the general theory and its analytical extensions. *Psychometrika* 1987; 52(3):345-70
13. Burnham KP, Anderson DR: Model selection and inference: a practical information - theoretical approach: Springer; 1998
14. Zucchini W. An introduction to model selection. *J Math Psy* 2000; 44:41-61
15. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22(5):431-45
16. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9(4):503-12
17. Bolstad WM: Introduction to Bayesian statistics. Hoboken: John Wiley & Sons Inc.; 2004
18. Davidian M, Giltinan DM. Some general estimation methods for nonlinear mixed-effects models. *J Biopharm Stat* 1993; 3(1):23-55
19. Neter J, Wasserman W, Kutner MH: Applied linear regression model. 2nd edition. Boston: Irwin; 1989
20. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977; 5(5):445-79
21. Beal SL, Sheiner LB. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng* 1982; 8(3):195-222
22. Beal SL. 1. Population pharmacokinetic data and parameter estimation based on their first two statistical moments. *Drug Metab Rev* 1984; 15(1&2):173-93
23. Sheiner BL, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9(5):635-51
24. Sheiner LB. The population approach to pharmacokinetic data analysis: rationale and standard data analysis methods. *Drug Metab Rev* 1984; 15(1-2):153-71

25. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. J Pharmacokinet Biopharm 1980; 8(6):553-71
26. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data. J Pharmacokinet Biopharm 1983; 11(3):303-19
27. Boeckmann A, Sheiner BL, Beal SL: Part V: Introductory Guide dans NONMEM Users Guide, édité par California Uo, San Francisco, 1994
28. Bauer RJ, Guzy S: Monte Carlo parametric expectation maximization (MC-PEM) method for analyzing population pharmacokinetic/pharmacodynamic data dans Advanced Methods of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Systems Analysis, édité par D'Argenio DZ, Los Angeles: Kluwer Academic Publisher, 2004:135-63
29. Beal SL, Sheiner BL: Part VII: Conditional Estimation Methods dans NONMEM Users Guide, édité par San Francisco: University of California, 1998
30. Bennett JE, Wakefield JC. A comparison of a Bayesian population method with two methods as implemented in commercially available software. J Pharmacokinet Biopharm 1996; 24(4):403-32
31. Grasela TH, Jr., Antal EJ, Townsend RJ, Smith RB. An evaluation of population pharmacokinetics in therapeutic trials. Part I. Comparison of methodologies. Clin Pharmacol Ther 1986; 39(6):605-12
32. Barrett JS: Population Pharmacokinetics dans Pharmacokinetics in drug discovery and development, édité par Schoenwald RD: CRC Press, 2002:315-56
33. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. J Pharmacokinet Biopharm 1993; 21(6):735-50
34. Girard P, Mentré F, A comparison of estimation methods in nonlinear mixed effects models using a blind analysis (online). 14th meeting of the Population Approach Group in Europe; 2005 Jun 16-17. Available from <http://www.page-meeting.org/page/page2005/PAGE2005O08.pdf> (Accessed 2009 Jan 13)

35. Steimer J-L, Mallet A, Golmard J-L, Boisvieux J-F. Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model. *Drug Metabolism Reviews* 1984; 15(1&2):265-92
36. Sheiner LB, Beal SL. Bayesian individualization of pharmacokinetics: simple implementation and comparison with non-Bayesian methods. *J Pharm Sci* 1982; 71(12):1344-8
37. Erichsen L, Agbaje OF, Luzio SD, Owens DR, Hovorka R. Population and individual minimal modeling of the frequently sampled insulin-modified intravenous glucose tolerance test. *Metabolism* 2004; 53(10):1349-54
38. Forrest A, Hawtof J, Egorin MJ. Evaluation of a new program for population PK/PD analysis - applied to simulated phase 1 data. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49(2):153
39. Roe DJ. Comparison of population pharmacokinetic modeling methods using simulated data: results from the Population Modeling Workgroup. *Stat Med* 1997; 16(11):1241-57; discussion 57-62
40. Dartois C, Lemenuel-Diot A, Laveille C, Tranchand B, Tod M, Girard P. Evaluation of uncertainty parameters estimated by different population PK software and methods. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2007; 34(3):289-311
41. Higuchi S, Fukuoka R, Aoyama T, Horioka M. Predicting serum lithium concentration using Bayesian method: a comparison with other methods. *J Pharmacobiodyn* 1988; 11(3):158-74
42. Fernandez de Gatta MM et al. Prediction of imipramine serum levels in enuretic children by a Bayesian method: comparison with two other conventional dosing methods. *Ther Drug Monit* 1989; 11(6):637-41
43. Yu DK, Hutcheson SJ, Wei G, Bhargava VO, Weir SJ. A comparison of population and standard two-stage pharmacokinetic analyses of vigabatrin data. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15(6):473-84

44. Vermes A, Math t RA, van der Sijs IH, Dankert J, Guchelaar HJ. Population pharmacokinetics of flucytosine: comparison and validation of three models using STS, NPEM, and NONMEM. *Ther Drug Monit* 2000; 22(6):676-87
45. Vicini P, Cobelli C. The iterative two-stage population approach to IVGTT minimal modeling: improved precision with reduced sampling. *Intravenous glucose tolerance test. Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(1):E179-86
46. Schoemaker RC, Cohen AF. Estimating impossible curves using NONMEM. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42(3):283-90
47. Duffull SB, Kirkpatrick CM, Green B, Holford NH. Analysis of population pharmacokinetic data using NONMEM and WinBUGS. *J Biopharm Stat* 2005; 15(1):53-73
48. Spiegelhalter DJ, Myles JP, Jones DR, Abrams KR. *Methods in health service research. An introduction to bayesian methods in health technology assessment. BMJ* 1999; 319(7208):508-12
49. De Gaetano A, Mingrone G, Castageneto M. NONMEM improves group parameter estimation for the minimal model of glucose kinetics. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):E932-7
50. FDA: Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, publié par 2005, <http://www.fda.gov/cder/guidance/5541fnl.htm>
51. Mahmood I: *Interspecies Pharmacokinetic Scaling: principles and application of allometric scaling*. Rockville, Maryland: Pine House Publishers; 2005
52. Mordenti J. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharm Sci* 1986; 75(11):1028-40
53. Lin JH. Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(10):1008-21

54. Collins JM: Phase 1 Clinical Studies dans Principles of Clinical Pharmacology, édité par Atkinson AJ, Daniels CE, Dedrick RL, Grudzinskas CV, Markey SP, San Diego: Academic Press, 2001:395-400
55. Tang H, Mayersohn M. A global examination of allometric scaling for predicting human drug clearance and the prediction of large vertical allometry. J Pharm Sci 2006; 95(8):1783-99
56. Santé Canada: aliments Dgdpsed, Interactions médicamenteuses: Études *in vitro* et *in vivo*, publié par Santé Canada - Publications, 2000, http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/interactions/drug_medi_int_f.html
57. Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. J Clin Pharmacol 2001; 41(11):1149-79
58. Houston JB, Kenworthy KE. In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. Drug Metab Dispos 2000; 28(3):246-54
59. Ito K, Houston JB. Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. Pharm Res 2004; 21(5):785-92
60. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38:461-99
61. FDA: Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro, publié par 1997, <http://www.fda.gov/cder/guidance/clin3.pdf>
62. FDA: Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: in vivo drug metabolism/drug interaction studies - study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling, publié par 1999, <http://www.fda.gov/cder/guidance/2635fnl.htm>

63. Rowland M, Balant L, Peck C. Physiologically based pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29-30, 2002). *Aaps J* 2004; 6(1):56-67
64. Andersen ME, Yang RSH, Clewell HJ, Reddy MB: Introduction: a historical perspective of the development and application of PBPK models dans Physiologically based pharmacokinetic modeling, édité par Reddy MB, Yang RSH, Clewell HJ, Andersen ME, Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2005:1-18
65. Nestorov I. Whole body pharmacokinetic models. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(10):883-908
66. Grass GM, Sinko PJ. Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54(3):433-51
67. Theil FP, Guentert TW, Haddad S, Poulin P. Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection. *Toxicol Lett* 2003; 138(1-2):29-49
68. Moghadamnia AA, Rostami-Hodjegan A, Abdul-Manap R, Wright CE, Morice AH, Tucker GT. Physiologically based modelling of inhibition of metabolism and assessment of the relative potency of drug and metabolite: dextromethorphan vs. dextrorphan using quinidine inhibition. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(1):57-67
69. Liu X et al. Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(3):1254-62
70. Katzung BG: Basic & Clinical Pharmacology. 8th edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2001
71. Tsuji A et al. Physiologically based pharmacokinetic model for beta-lactam antibiotics I: Tissue distribution and elimination in rats. *J Pharm Sci* 1983; 72(11):1239-52

72. Tsuji A, Nishide K, Minami H, Nakashima E, Terasaki T, Yamana T. Physiologically based pharmacokinetic model for cefazolin in rabbits and its preliminary extrapolation to man. *Drug Metab Dispos* 1985; 13(6):729-39
73. Igari Y, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M. Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharmacokinet Biopharm* 1983; 11(6):577-93
74. Gustafson DL, Rastatter JC, Colombo T, Long ME. Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. *J Pharm Sci* 2002; 91(6):1488-501
75. Bjorkman S, Wada DR, Stanski DR, Ebling WF. Comparative physiological pharmacokinetics of fentanyl and alfentanil in rats and humans based on parametric single-tissue models. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22(5):381-410
76. Bjorkman S, Wada DR, Stanski DR. Application of physiologic models to predict the influence of changes in body composition and blood flows on the pharmacokinetics of fentanyl and alfentanil in patients. *Anesthesiology* 1998; 88(3):657-67
77. Hosseini-Yeganeh M, McLachlan AJ. Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(7):2219-28
78. Plowchalk DR, Teeguarden J. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for estradiol in rats and humans: a biologically motivated quantitative framework for evaluating responses to estradiol and other endocrine-active compounds. *Toxicol Sci* 2002; 69(1):60-78
79. El-Masri HA, Portier CJ. Physiologically based pharmacokinetics model of primidone and its metabolites phenobarbital and phenylethylmalonamide in humans, rats, and mice. *Drug Metab Dispos* 1998; 26(6):585-94
80. Ebling WF, Wada DR, Stanski DR. From piecewise to full physiologic pharmacokinetic modeling: applied to thiopental disposition in the rat. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22(4):259-92

81. Brightman FA, Leahy DE, Searle GE, Thomas S. Application of a generic physiologically based pharmacokinetic model to the estimation of xenobiotic levels in human plasma. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):94-101
82. Brightman FA, Leahy DE, Searle GE, Thomas S. Application of a generic physiologically based pharmacokinetic model to the estimation of xenobiotic levels in rat plasma. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):84-93
83. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci* 2002; 91(5):1358-70
84. Bjorkman S, Wada DR, Berling BM, Benoni G. Prediction of the disposition of midazolam in surgical patients by a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharm Sci* 2001; 90(9):1226-41
85. Bjorkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 59(6):691-704
86. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50 Suppl 1:S41-67
87. Yu LX, Amidon GL. Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45(2):199-203
88. Yu LX, Crison JR, Amidon GL. Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int J Pharm* 1996; 140:111-8
89. Ito K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption--theoretical approach. *Pharm Res* 1999; 16(2):225-31
90. Tam D, Sun H, Pang KS. Influence of P-glycoprotein, transfer clearances, and drug binding on intestinal metabolism in Caco-2 cell monolayers or membrane preparations: a theoretical analysis. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(10):1214-26

91. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm* 2004; 277(1-2):3-9
92. Cummins CL, Jacobsen W, Benet LZ. Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(3):1036-45
93. Zhao YH et al. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm Res* 2002; 19(10):1446-57
94. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--gastrointestinal absorption. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(7):905-16
95. Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* 1995; 11(3-4):187-94
96. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res* 1997; 14(12):1655-8
97. Artursson P, Ungell AL, Lofroth JE. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res* 1993; 10(8):1123-9
98. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46(1-3):27-43
99. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm* 1996; 127:103-7
100. Karlsson J, Artursson P. A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers. *Int J Pharm* 1991; 71:55-64
101. Englund G et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29(3-4):269-77

102. Stephens RH, O'Neill CA, Warhurst A, Carlson GL, Rowland M, Warhurst G. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(2):584-91
103. Taipalensuu J et al. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(1):164-70
104. Mouly S, Paine MF. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res* 2003; 20(10):1595-9
105. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--evaluation of methods for prediction of hepatic metabolic clearance. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(6):803-28
106. De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Gilissen RA, Mackie CE, Nijssen MJ. The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(4):649-59
107. Ito K, Houston JB. Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches. *Pharm Res* 2005; 22(1):103-12
108. Riley RJ, McGinnity DF, Austin RP. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(9):1304-11
109. Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(10):1316-24
110. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics - evaluation of methods for prediction of volume of distribution. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(9):1181-90
111. Poulin P, Schoenlein K, Theil FP. Prediction of adipose tissue: plasma partition coefficients for structurally unrelated drugs. *J Pharm Sci* 2001; 90(4):436-47

112. Poulin P, Theil FP. A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J Pharm Sci* 2000; 89(1):16-35
113. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci* 2002; 91(1):129-56
114. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci* 2005; 94(6):1259-76
115. Cai H et al. Evaluation of an integrated in vitro-in silico PBPK (physiologically based pharmacokinetic) model to provide estimates of human bioavailability. *Int J Pharm* 2006; 308(1-2):133-9
116. Jones HM, Parrott N, Jorga K, Lave T. A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(5):511-42
117. Luttringer O, Theil FP, Poulin P, Schmitt-Hoffmann AH, Guentert TW, Lave T. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of disposition of epiroprim in humans. *J Pharm Sci* 2003; 92(10):1990-2007
118. Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruelisauer A, Niederberger W, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22(5):327-65
119. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287(2):457-68
120. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; 27(6):597-623
121. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Dose-dependent pharmacokinetics of cyclosporin A in rats: events in tissues. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(5):582-9

122. Bernareggi A, Rowland M. Physiologic modeling of cyclosporin kinetics in rat and man. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991; 19(1):21-50
123. Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 2006; 112(1):184-98
124. Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques, version en ligne (e-CPS), édité par Canada Adpd, 2007, <https://www.e-therapeutics.ca>
125. Krensky AM, Vincenti F, Bennett WM: Section X - Immunomodulators, Chapter 52. Immunosuppresseurs, tolérants et immunostimulants dans Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, édité par Brunton LL, USA: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2006
126. AHFS Drug Information, édité par McEvoy GK, Bethesda, MD, 2007, <http://online.statref.com>
127. Marieb EN, Laurendeau G: Anatomie et physiologie humaines. Saint-Laurent: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.; 1993
128. Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 1986; 11(2):107-32
129. Quan DJ, Winter ME: Immunosuppresseurs: cyclosporine, tacrolimus and sirolimus dans Basic Clinical Pharmacokinetics, édité par Troy DB, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2004:228-50
130. Bistrup C, Nielsen FT, Jeppesen UE, Dieperink H. Effect of grapefruit juice on Sandimmun Neoral absorption among stable renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(2):373-7
131. Edwards DJ et al. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65(3):237-44
132. Physicians' Desk Reference. 57 edition. Montvale, New Jersey; 2005
133. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001; 14(6):611-50

134. Otyepka M, Skopalik J, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(3):376-89
135. Plant N. The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770(3):478-88
136. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270(1):414-23
137. Lapple F et al. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 2003; 13(9):565-75
138. Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(11):1350-9
139. Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(7):804-9
140. Paine MF et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283(3):1552-62
141. Yang J, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76(4):391
142. von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivisto KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(3):172-83
143. Dauchy S et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem* 2008; 107(6):1518-28

144. Dutheil F, Beaune P, Lorient MA. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* 2008; 90(3):426-36
145. Kapitulnik J, Strobel HW. Extrahepatic drug metabolizing enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 1999; 13(5):227-30
146. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43:149-73
147. Aleksa K, Matsell D, Krausz K, Gelboin H, Ito S, Koren G. Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(7):872-85
148. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(3):219-34
149. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21(7):778-96
150. Rodrigues DA (Ed.): *Drug-Drug Interactions*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2002
151. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001; 31(8-9):469-97
152. Chan LM, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21(1):25-51
153. Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res* 2005; 22(10):1559-77
154. Stockley IH: *Drug Interactions*. 5e edition. London: Pharmaceutical Press; 1999
155. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35(5):361-90

156. Lewis DF, Lake BG, Dickins M. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) in inhibitors of various cytochromes P450: the importance of compound lipophilicity. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; 22(1):1-6
157. Hollenberg PF. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* 2002; 34(1-2):17-35
158. Chang TK, Yeung RK. Effect of trans-resveratrol on 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin O-dealkylation catalyzed by human recombinant CYP3A4 and CYP3A5. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79(3):220-6
159. Zhou S et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44(3):279-304
160. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *Faseb J* 2002; 16(13):1799-801
161. Vossen C, Erard M. Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide--HNF4 as a model system. *Med Sci Monit* 2002; 8(10):RA217-20
162. Miyoshi M et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in down-regulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein by endotoxin. *Eur J Pharmacol* 2005; 507(1-3):229-37
163. Fradette C, Du Souich P. Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Curr Drug Metab* 2004; 5(3):257-71
164. Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(3):159-68
165. Gimenez F, Fernandez C, Mabondzo A. Transport of HIV protease inhibitors through the blood-brain barrier and interactions with the efflux proteins, P-glycoprotein and multidrug resistance proteins. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(2):649-58

Chapitre 3

Méthodologie

3.1 Étude comparative entre différentes méthodes d'analyses compartimentales individuelle et de population

Les principes généraux de l'analyse compartimentale individuelle et de population ont été énoncés au chapitre précédent. Les particularités des différentes méthodes incluses dans l'étude comparative présentée au chapitre 6 sont présentées ici. Ces méthodes sont l'analyse standard en deux étapes (STS), analyse globale en deux étapes (GTS), méthode itérative en deux étapes (IT2S) et les logiciels KineticaTM et NONMEM[®].

3.1.1 Simulation des données

Nous voulions évaluer la capacité des méthodes à estimer les différents paramètres dans un contexte où les modèles structuraux et de variances étaient connus. Bien que dans la réalité ce ne soit jamais le cas et que la recherche du meilleur modèle constitue une phase essentielle de la modélisation, la spécification du modèle lui-même peut être une source d'erreur. Afin de s'en tenir strictement à la question de l'estimation des paramètres, nous avons éliminé les possibilités d'erreurs associées à une mauvaise spécification du modèle en utilisant des données simulées. Un total de 46 études ont été simulées avec un nombre variable d'individus (6 à 200), des voies d'administration orale (PO) ou intraveineuse (IV), des stratégies d'échantillonnages riches ou éparses et un nombre de compartiments dans les modèles structuraux qui variait entre 1 et 3. De plus, l'échantillonnage était soit uniquement dans le plasma ou bien à la fois dans le plasma et l'urine. Les paramètres pharmacocinétiques avaient une distribution normale (N) ou log-normale (logN). Du point de vue de la pharmacocinétique de population, un échantillonnage est considéré comme étant épars lorsqu'il y a moins d'échantillons pour un individu qu'il y a de paramètres à déterminer. Les temps

d'échantillonnage étaient cependant toujours distribués pour faire en sorte que toutes les phases des profils pharmacocinétiques étaient caractérisées. Les simulations ont été faites avec le programme ADAPT II® Version IV. Le détail des études simulées est présenté au chapitre 6. Il est important de souligner que la personne qui modélisait les données n'était pas la même que celle qui les avait simulées. Par conséquent, bien que la personne ajustant les données connaissait le modèle structural et les modèles de variance à utiliser, elle ne connaissait pas la valeur des paramètres (modélisation à l'aveugle).

3.1.2 *Standard-Two-Stage (STS) et Global-Two-Stage (GTS)*

STS et GTS sont deux méthodes très apparentées et qui ont été appliquées avec le logiciel ADAPT II® Version IV [1]. Dans les deux cas, les données de chacun des individus étaient modélisées séparément et les caractéristiques de la population étaient déterminées simplement par des statistiques descriptives à partir des paramètres individuels. ADAPT II® est un programme très flexible car le modèle structural et le modèle de variabilité résiduelle sont entièrement spécifiés par l'utilisateur. Comme celui-ci écrit lui-même toutes les équations différentielles du modèle structural, tous les types de modèles peuvent être évalués.

La première étape dans l'analyse par les méthodes STS et GTS consiste d'abord à fixer la variabilité résiduelle à des valeurs assez faibles (5-10%) pour ne faire varier que la valeur des paramètres pharmacocinétiques et en quelque sorte forcer le modèle à passer le plus près possible des valeurs expérimentales. Si on ne passe pas par cette première étape, il se peut que l'algorithme de minimisation n'ajuste pas vraiment les données et associe plutôt les variations de concentrations à de la variabilité résiduelle. La seconde étape consiste ensuite à utiliser les valeurs de paramètres provenant de la première estimation comme valeur *a priori* pour l'estimation suivante. Lors de cette seconde estimation, les paramètres décrivant la variabilité résiduelle ne sont plus fixés mais plutôt ajustés au même titre que les paramètres pharmacocinétiques. Là s'arrête l'estimation par STS.

Ce que nous appelons ici GTS n'est pas exactement la méthode GTS décrite par Prévost [2] et Steimer [3]. La méthode GTS utilisée ici consiste en une répétition de la seconde étape

de l'estimation par la méthode STS, le plus souvent en utilisant les résultats d'une estimation précédente comme valeur *a priori* d'une estimation subséquente. Bien qu'il s'agisse à la base d'une méthode d'estimation individuelle, comme c'est la population en général que nous analysons, les valeurs données *a priori* sont les mêmes pour tous les individus et la qualité de l'ajustement est jugée en fonction de l'ensemble des individus. On répète ainsi les estimations jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'amélioration tangible dans l'ajustement des données. La qualité de l'ajustement est principalement évaluée par le critère AIC.

Différents estimateurs sont disponibles avec ADAPT II® pour procéder à l'analyse des données. Nous avons utilisé l'estimateur du maximum de vraisemblance (ML) pour être cohérent avec les autres méthodes utilisées dans l'étude comparative. Le ML permet de trouver les paramètres et la variabilité résiduelle dans une seule et même étape, ce qui est souhaitable en ce qui concerne la pharmacocinétique. La fonction objective à minimiser pour un individu *i* est dans ce cas le négatif du log de la vraisemblance (O_{NLL}) [1] :

$$O_{NLL} = \frac{n}{2} \cdot \ln(2\pi) + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^l \sum_{j=1}^m \left[\frac{(y_{ijk,obs} - y_{ijk,pred})^2}{Var(y_{ijk,obs})} + \ln Var(y_{ijk,obs}) \right] \quad (1)$$

où *k* représente le type d'observation (plasma, urine, etc) mesuré au temps *j* et *n* est le nombre d'observations totales pour l'individu *i*. Pour chaque individu, l'algorithme Nelder-Mead Simplex est utilisé pour trouver les paramètres pharmacocinétiques et de variance qui vont minimiser O_{NLL} [1, 4].

3.1.3 Méthode itérative en deux étapes (IT2S : Iterative-Two-Stage)

La méthode itérative en deux étapes (IT2S) est en quelque sorte une prolongation de la méthode STS. C'est une méthode d'analyse de population Bayésienne développée par A. Forrest [5, 6], basée sur certains modules d'analyse d'ADAPT II® et sur les travaux précédents de Prévost [2] et Steimer [3]. On doit d'abord fournir des estimés initiaux des valeurs des paramètres (PK, variance, variabilité résiduelle) pour débiter le processus itératif. Dans l'étude présentée au chapitre 6, la méthode STS décrite dans la section précédente a été utilisée pour obtenir les estimés initiaux. Lors de la première étape d'une itération, les paramètres de chacun

des individus sont estimés par une approche du maximum de vraisemblance. Lors des étapes subséquentes, la fonction objective diffère cependant de l'équation 1 car on utilise cette fois-ci un estimé Bayésien avec comme estimateur la probabilité maximale *a posteriori* (MAP : maximum *a posteriori* probability). Ainsi, les valeurs individuelles sont modélisées en fonction des valeurs de population les plus probables lors de chacune des itérations de population. Pour des paramètres distribués normalement, la fonction objective pour le MAP (O_{MAP}) est la suivante :

$$O_{MAP} = \sum_{k=1}^l \sum_{j=1}^m \left[\frac{(y_{ijk,obs} - y_{ijk,calc})^2}{Var(y_{ijk,obs})} + \ln Var(y_{ijk,obs}) \right] + [\alpha - \Theta]^T \Omega^{-1} [\alpha - \Theta] \quad (2)$$

où α est le vecteur des paramètres pharmacocinétiques pour un individu, Θ le vecteur des paramètres pharmacocinétiques de la population et Ω la matrice de covariance des paramètres de population. L'algorithme va donc minimiser l'écart entre les valeurs individuelles et de population. A la fin de la première étape de l'itération, on obtient donc pour chaque individu un ensemble de valeurs pour les paramètres PK et une matrice de covariance individuelle. Durant la seconde étape du processus itératif, un nouvel estimé des valeurs de population, Θ et Ω , est recalculé à partir de tous les estimés individuels. Ces nouvelles valeurs sont ensuite mises à jour dans l'équation 2 pour recommencer l'étape 1. L'estimé de Ω est une combinaison des matrices individuelles obtenues à l'étape 1 et d'une matrice de covariance obtenue à partir des estimés des paramètres PK de la population obtenus à l'étape 2. Les deux étapes sont répétées jusqu'à ce que les résultats convergent. Dans l'étude présentée au chapitre 6, nous considérons que les résultats avaient convergé lorsque la variation dans les estimés de population demeurait à l'intérieur de 1% pour au moins 200 itérations de population consécutives.

Durant le processus itératif qui vient d'être décrit, la variabilité résiduelle $Var(\varepsilon_i)$ est fixée et est décrite par un modèle proportionnel et additif, tel qu'énoncé au chapitre 2.

$$Var(\varepsilon_{ik}) = Var(y_{ik,obs}) = (y_{ik,pred} \cdot \sigma_{k,slope} + \sigma_{k,int er})^2 \quad (3)$$

Afin d'estimer cette variabilité, on commence d'abord par faire une première série d'itérations avec une valeur initiale obtenu par la méthode STS par exemple. Au bout d'un

certain nombre d'itérations, on fait une régression linéaire des $y_{ijk,obs}$ en fonction des $y_{ijk,pred}$ en fixant la pente à 1. Les valeurs des déviations standards autour de la pente ($\sigma_{k,slope}$) et de l'intercept ($\sigma_{k,inter}$) sont utilisées dans l'équation comme nouvelles valeurs pour les itérations suivantes. On répète ce processus jusqu'à ce que les résultats des régressions linéaires soient stables.

3.1.4 NONMEM®

Le programme NONMEM®, pour Nonlinear-Mixed-Effect-Modeling, utilise une méthodologie différente de IT2S. Bien que tous les individus demeurent indentifiables, toutes les données sont combinées et modélisées simultanément. Le modèle hiérarchique de base de la cinétique de population a déjà été décrit au Chapitre 2. Un bref rappel : on définit d'abord chaque individu par un modèle structural et un terme de variabilité résiduelle (ou intraindividuelle) pour ensuite décrire la pharmacocinétique de la population, i.e. la relation entre les individus. Nous avons également énoncé au Chapitre 2 qu'étant donné que les équations pharmacocinétiques décrivant l'évolution des concentrations dans le temps ne sont pas linéaires par rapport à leurs paramètres, il n'existe pas de solution analytique à L, la vraisemblance jointe. NONMEM propose quelques méthodes pour approximer l'intégrale de la fonction L [7]. Nous en avons utilisé deux dans le cadre de l'étude comparative présentée au chapitre 6. Il s'agit de la méthode de premier ordre (FO : first order estimation method) et de la méthode de premier ordre conditionnelle (FOCE : first order conditional estimation method). Dans les deux cas, l'approximation de l'intégrale consiste à appliquer une méthode d'approximation des intégrales qui nous vient du mathématicien Laplace. Il s'agit d'une expansion en série de Taylor autour des η_i où les termes en dérivés secondes sont ignorés, d'où le terme "premier ordre". Pour la méthode FO, les η_i sont tous considérés comme étant égaux à la moyenne de la population, i.e. 0. Pour la méthode FOCE, les η_i sont ceux estimés.

3.1.5 Kinetica™

Kinetica™ (version 4.3) est une autre méthode également basée sur un estimateur du maximum de vraisemblance et qui utilise un modèle pharmacostatistique hiérarchique. Ce

programme utilise l'algorithme EM (pour Expectation-Maximisation), un algorithme en 2 étapes que l'on représente par l'étape-E (valeur attendue) et l'étape-M (maximisation) [8-11]. En assumant que les valeurs initiales des paramètres de population sont conditionnelles aux valeurs observées, les valeurs de paramètres les plus probables pour chaque individu sont obtenues lors de l'étape-E. C'est par un estimé Bayésien MAP semblable à celui présenté pour IT2S à l'équation 2 que les estimés individuels sont obtenus, à la différence que tous les paramètres, fixes et aléatoires, sont estimés en même temps. L'étape-M consiste ensuite à obtenir par le maximum de vraisemblance les valeurs *a posteriori* de la moyenne de population des paramètres, leur variance et la variabilité résiduelle, étant donné les estimés individuels obtenus à l'étape-E. La fonction de vraisemblance jointe L est approximée de la même manière que pour la méthode FOCE dans NONMEM, i.e. par une expansion en série de Taylor autour des η_i estimés [9]. Le processus itératif s'arrête lorsque la différence entre deux estimés successifs est suffisamment petite. La valeur utilisée comme critère d'arrêt dans l'étude comparative présentée au Chapitre 6 était de 0.001.

3.2 Passage de l'étape pré-clinique à clinique : comparaison entre l'allométrie et la modélisation à base physiologique

Les principes de base de l'allométrie ont déjà été décrits au chapitre précédent. En ce qui a trait au modèle physiologique de distribution de la cyclosporine précédemment publié dans la littérature et dont nous nous sommes inspiré, en voici les principes dans ce qui suit. Le modèle d'absorption intestinale de la cyclosporine est présenté au chapitre 5.

Le modèle physiologique de distribution de la cyclosporine est celui développé par l'équipe de M. Rowland [12]. Il s'agit d'un modèle qui tient compte dans un premier temps de la liaison de la cyclosporine aux érythrocytes. Le pourcentage de cyclosporine liée varie en fonction de la concentration de cyclosporine et est saturable. Cette liaison est décrite par un isotherme défini par le nombre de sites de liaison (nP_T) dans les érythrocytes, une constante de dissociation ($K_{D,BC}$) ainsi que par un coefficient de perméabilité (PS_{BC}). Le transfert entre le sang et les tissus se fait dans un premier temps entre le plasma et le liquide interstitiel par la fraction libre

(f_u) de cyclosporine seulement et l'équilibre est instantané. Le transfert dans les cellules tissulaires est ensuite défini par un coefficient de perméabilité (PS_{Tissus}). Enfin, la distribution de la cyclosporine à l'intérieur des cellules tissulaires est décrite par deux réservoirs. Un premier dit à équilibre rapide (R) et un second dit à interaction lente (S) où la cyclosporine peut se lier avec des constantes d'association (k_{ass}) et de dissociation (k_{dis}) de premier ordre. Ce modèle de distribution tissulaire est présenté à la Figure 1. Ensuite, les organes sont reliés entre eux par la circulation sanguine selon le schéma présenté à la Figure 3 du chapitre 2.

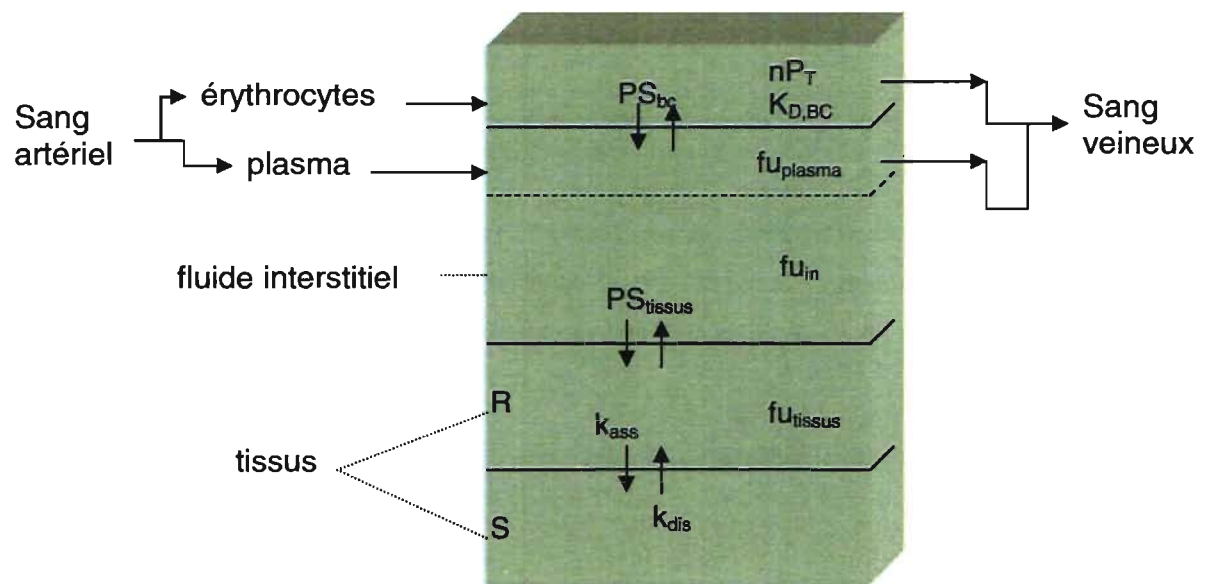


Figure 1: Schéma du modèle de distribution de la cyclosporine dans les tissus.

Les différents paramètres décrivant la distribution tissulaire de la cyclosporine avaient d'abord été modélisés pour chacun des organes chez le rat. Pour amener le modèle à l'échelle humaine, on considère que l'isotherme décrivant la liaison de la cyclosporine aux érythrocytes est le même chez l'humain et chez le rat. En fait, l'isotherme avait été développé à partir de sang humain et appliqué au rat. On suppose ensuite que la fraction libre dans les divers compartiments tissulaires et sanguins est la même d'une espèce à l'autre, tout comme les constantes d'association et de dissociation (k_{ass} et k_{dis}). Le volume des organes ainsi que le flux

sanguin à chacun de ces organes sont changés pour les valeurs d'un humain de 70 kg. Enfin le paramètre de perméabilité (PS_{tissus}) pour chacun des tissus est ajusté en appliquant une équation allométrique :

$$PS_{\text{tissus}} = a * M^b \quad (4)$$

où l'exposant b est fixé à 1. Pour ce qui est de la clairance hépatique chez l'humain (CL_H), Rowland et al. n'ont pas utilisé de modèle prédictif pour la détermination de la CL_H . Ils ont simplement utilisé la valeur de CL_H trouvée de façon non-compartmentale à partir de leurs données obtenues suite à une administration intraveineuse de cyclosporine chez des volontaires sains. En supposant que l'élimination est exclusivement hépatique, la CL_H est alors obtenue par le rapport Dose/AUC_{inf}. Nous avons par contre utilisé quelques valeurs de CL_H trouvées dans la littérature et qui étaient prédites à partir de $CL_{\text{int,H}}$ estimées in vitro par des systèmes de microsomes hépatiques ou d'hépatocytes (voir les détails au chapitre 5). C'est donc à ce modèle physiologique de distribution tissulaire que nous avons ajouté un modèle d'absorption de la cyclosporine au niveau des intestins. Ce modèle est présenté au chapitre 5.

3.3 Cyclosporine et interactions médicamenteuses

Les détails de l'étude clinique portant sur l'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberge sont décrits au chapitre 4.

3.4 Références

1. D'Argenio DZ, Schumitzky A: ADAPT II: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software User's Guide to Release 4. Los Angeles: University of Southern California; 1997
2. Prévost G, Estimation of a normal probability density function from samples measured with non-negligible and non-constant dispersion. Internal report, Adersa-Gerbios, Palaiseau, France,
3. Steimer J-L, Mallet A, Golmard J-L, Boisvieux J-F. Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model. Drug Metabolism Reviews 1984; 15(1&2):265-92
4. D'Argenio DZ, Schumitzky A. A program package for simulation and parameter estimation in pharmacokinetic systems. Comput Programs Biomed 1979; 9(2):115-34
5. Forrest A, Ballow CH, Nix DE, Birmingham MC, Schentag JJ. Development of a population pharmacokinetic model and optimal sampling strategies for intravenous ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37(5):1065-72
6. Forrest A, Hawtof J, Egorin MJ. Evaluation of a new program for population PK/PD analysis - applied to simulated phase 1 data. Clin Pharmacol Ther 1991; 49(2):153
7. Beal SL, Sheiner BL: Part VII: Conditional Estimation Methods dans NONMEM Users Guide, édité par San Francisco: University of California, 1998
8. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. J R Statist Soc 1977; Series B, 39:1-38
9. InnaPhase: Appendix A: population methodology dans Kinetica(TM) Version 43 User Manual, édité par, 2003-2004:A1-A20
10. Laird NM, Ware JH. Random-effects models for longitudinal data. Biometrics 1982; 38(4):963-74

11. Sanathanan LP. Random effects modeling in population: kinetic/dynamic analysis. Drug Info J 1991; 25:307-18
12. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. J Pharmacol Exp Ther 1998; 287(2):457-68

Chapitre 4

**Pomelo juice but not cranberry juice affects the
pharmacokinetics of cyclosporine in humans**

**Le jus de pomelo modifie la pharmacocinétique de la
cyclosporine mais pas le jus de canneberge**

Publié dans Clinical Pharmacology and Therapeutics 2006; 79(3): 255-62.

4.1 Préambule à l'étude d'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberges

Bien qu'il y ait déjà plusieurs données de publiées sur la cyclosporine dans la littérature, il était nécessaire d'avoir nos propres données afin de pouvoir valider le modèle PBPK que nous avons construit et qui est présenté au chapitre 5. Dans la littérature, les profils de concentrations sont généralement présentés sous forme de graphiques avec les concentrations moyennes. Bien que cela donne une bonne idée du genre de profils auxquels on peut s'attendre, une partie de l'information est perdue. On voit bien à la Figure 1 que les profils individuels sont très variables d'un individu à l'autre, particulièrement pour les six ou huit heures suivant la dose. (Ces données proviennent de l'étude présentée dans le présent chapitre.) Il est plus intéressant de voir où nos prédictions se situent par rapport à l'ensemble des points expérimentaux que seulement par rapport au profil moyen.

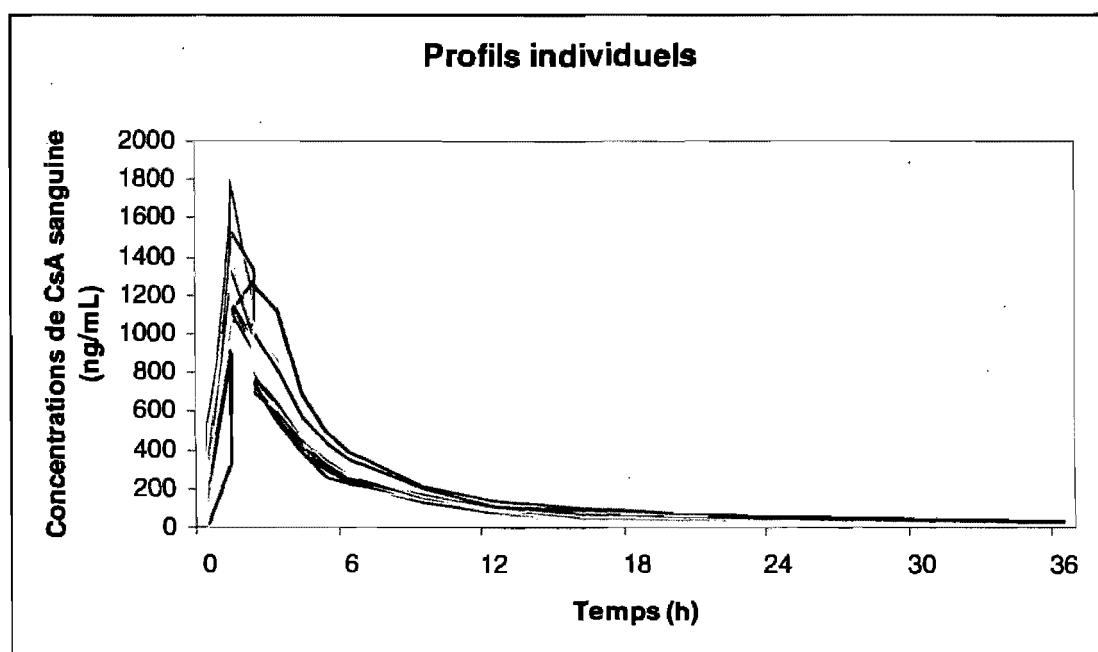


Figure 1: Profils des concentrations sanguines de cyclosporine (CsA) chez 12 volontaires sains suivant une dose orale de 200 mg de Neoral® administré avec de l'eau.

Une étude dans laquelle on ne ferait qu'administrer la cyclosporine de façon orale avec de l'eau n'aurait pas d'autre intérêt que celui de générer des données brutes. Afin de rendre l'étude plus intéressante d'un point de vue clinique, l'étude s'est faite sous la forme d'une étude d'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberges chez 12 volontaires sains. La cyclosporine étant un médicament avec un index thérapeutique étroit, les interactions avec des substances, médicamenteuses ou alimentaires, peuvent avoir des conséquences graves. Le jus de pamplemousse est bien connu pour ses interactions avec les médicaments substrats des CYP3A et de la P-gp comme la cyclosporine. Comme il est mentionné avec plus de détails à la section 5.2, le pomelo est un proche parent du pamplemousse et contient les mêmes composés chimiques tenus responsable de ces interactions. Les effets possibles du jus de canneberges n'avaient jamais été étudiés de façon systématique *in vivo*. Seul un cas possible d'interaction avec la warfarine était rapporté dans la littérature. Comme le jus de canneberge est un breuvage devenu très populaire, entre autre pour ses vertus supposément bénéfiques contre les infections urinaires, nous avons jugé pertinent de tester son potentiel d'interaction pharmacocinétique avec la cyclosporine. Ainsi donc, nous avons réalisé une étude randomisée en chassé-croisé comportant trois traitements, soient une dose simple de 200 mg de cyclosporine administré avec un verre d'eau, de jus de pomelo ou de jus de canneberges. On verra dans ce qui suit que le jus de pomelo augmente de façon significative la biodisponibilité de la cyclosporine mais que le jus de canneberge n'a pas d'effet.

POMELO JUICE BUT NOT CRANBERRY JUICE AFFECTS THE PHARMACOKINETICS OF CYCLOSPORINE IN HUMANS

Julie Grenier^{1,2}, M.Sc , Caroline Fradette¹, Ph.D., Gaetano Morelli¹, MD, Gerald J. Merritt¹, Pharm.D., Manon Vrandeick¹, D.E.C., and Murray P. Ducharme^{1,2}, Pharm.D., Montréal, Québec, Canada

From (1) MDS Pharma Services, Montréal, Canada and (2) Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Canada.

Some of the data in this article have previously been submitted as an abstract and poster presentation (No.PII-111) at the Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics: March 5, 2005; Orlando, FL. The abstract was published previously (Clin Pharmacol Ther 2005;77(2):P80).

This project was supported by MDS Pharma Services.

Reprint requests: Murray P. Ducharme, Pharm.D., MDS Pharma Services, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Department, 2350 Cohen, Montréal, Québec, Canada, H4R 2N6.



4.2 Abstract

Background and objective: Cyclosporine is a CYP3A and P-gp substrate whose bioavailability increases when administered with grapefruit juice. It is unknown if pomelo, a closely related citrus fruit, interacts with cyclosporine in humans. In addition, a case study reports that cranberry juice interacts with warfarin, a drug with a narrow therapeutic range. Cranberries have a high content in flavonoids, compounds with various metabolic effects, including interaction with P-gp *in vitro*. Although the effect of flavonoids is less evident *in vivo*, cranberry juice has become a very popular beverage and it was deemed important to investigate whether it has an effect on the disposition of cyclosporine, another narrow therapeutic range drug.

Methods: In an open-label, randomized, 3-way crossover design with a 14-day washout between each dose, 12 healthy male volunteers received single oral 200 mg doses of cyclosporine according to the following regimens: 200 mg cyclosporine administered with 240 mL of pomelo juice, cranberry juice or water under fasting conditions. Multiple whole blood samples were collected up to 36 hours after each dose. Concentrations were determined using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method.

Results: Administration of pomelo juice with cyclosporine increased the area under the curve (AUC_t), the AUC from time 0 to infinity (AUC_{inf}) and C_{max} of cyclosporine with a ratio of least-squares-mean (LSM) and 95% confidence interval (CI) of 119.4%(113.4-125.8%), 118.9%(113.8-124.3%) and 112.1%(102.3-122.8%), respectively. All 3 variables exhibited statistically significant increases (with the Bonferonni adjustment) with P=0.0001 for AUC_t and AUC_{inf} and P=0.0167 for C_{max}; however, only the increase in AUC_t was judged clinically significant with 95%CI outside the 80-125% boundaries. Cranberry juice had no clinically significant effect on the overall disposition of cyclosporine. After administration of cyclosporine with cranberry juice, the ratios of LSM (with 95%CI) for AUC_t, AUC_{inf} and C_{max} for cyclosporine were 95.0%(90.3-100.1%), 93.4%(89.2-97.8%) and 95.2%(86.9-104.2%), respectively.

Conclusion: These results suggest that pomelo juice increases the bioavailability of cyclosporine, possibly by inhibiting CYP3A and/or P-gp activity in the gut wall. However, drinking a glass of cranberry juice does not appear to influence significantly the disposition of cyclosporine.

4.3 Introduction

Cyclosporine is a cyclic peptide of fungal origin used to prevent organ rejection after transplantation, and to treat severe rheumatoid arthritis and psoriasis. Cyclosporine is a CYP3A and P-glycoprotein (P-gp) substrate whose coadministration with grapefruit juice increases its bioavailability in healthy volunteers and renal transplant patients [1, 2]. Some furanocoumarins found in grapefruit juice are known to inhibit CYP3A enzymes [1, 3, 4]. Grapefruit juice also inhibits drug transport by P-gp [5, 6]. These two mechanisms are likely responsible for the increased bioavailability of cyclosporine when administered with grapefruit juice [1].

Pomelo is a citrus fruit well known in Asia but also available in western countries. In Chinese medicine, the pericarps of pomelo (*citrus grandis*) are used as antitussives and expectorants.[7] Pomelo is closely related to grapefruit and both fruits share common furanocoumarins such as 6',7'-dihydroxybergamottin. While 6',7'-dihydroxybergamottin is present in similar quantities in pomelo and grapefruit, pomelo has much less bergamottin [3]. Although it is unknown if pomelo interacts with cyclosporine in humans, pomelo does increase cyclosporine bioavailability in swine [7] and inhibits the transport of digoxin by P-gp in Caco-2 cells *in vitro* [8]. It was also reported that extracts of pomelo could inhibit CYP3A4, but pomelo inhibited P-gp only slightly *in vitro*. [9] There was one case reported of a possible interaction between pomelo and tacrolimus, also an immunosuppressive drug substrate of CYP3A and P-gp. The monitoring of tacrolimus blood concentrations in a patient revealed higher concentrations than usual after the intake of a fresh pomelo [10].

In addition, a case study reported a possible interaction between cranberry juice and warfarin [11, 12]. An array of CYP enzymes metabolizes warfarin to a variety of monohydroxylated metabolites. S-warfarin, the active enantiomer, is mainly metabolized by

CYP2C9 while R-warfarin is mainly metabolized by CYP3A and CYP1A2 [13]. Warfarin is the only drug that we could find for which interactions with cranberry juice is mentioned in the literature. Cranberry juice has become a very popular beverage but its potential interaction with drugs has not been well studied. The effect of cranberry juice on the pharmacokinetics of cyclosporine was therefore studied to see if cranberry juice could affect the disposition of a substrate for CYP3A enzymes and the P-glycoprotein (P-gp) transporter.

4.4 Methods

4.3.1 Subjects

Twelve healthy adult male volunteers between 18 and 55 years of age were enrolled in the study after giving their written informed consent before study start. All 12 volunteers completed the study. Subjects abstained from consuming any drugs and other substances known to be strong inhibitors of CYP enzymes, as well as food containing grapefruit, pomelo or cranberry for 10 days prior to the first dose and throughout the study. Strong inducers of CYP enzymes were prohibited for 28 days prior to the first dose and during the study. Subjects were also instructed not to take any medication or herbal products for 7 days prior to the first dose and throughout the study. Food containing xanthine and alcohol were prohibited for 24 and 48 hours, respectively, prior to each dose and throughout the sample collection periods.

4.3.2 Study design

The protocol and informed consent form were approved by the MDS Institutional Review Board, Montreal, Canada. All subjects participating in the study signed an informed consent form before study start. This was an open-label, randomized 3-way crossover study with 3 sequences. On the evening before each dosing, subjects were admitted to the MDS Clinical Research Center (Montreal, Canada). After an overnight fast, subjects received a single oral 200 mg dose (2 capsules) of cyclosporine soft gelatin capsules (Neoral®, Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.) with 240 mL of one of the following beverages in each period: pomelo juice, cranberry juice or water. Subjects fasted for at least 4 hours after dosing, and

water was not permitted for 1 hour before and after the dose. Dosing days were separated by a 14-day washout period. By the end of the study, each subject had received all 3 beverages with the study medication.

Fresh red pomelos (*citrus grandis*, Sunkist, California) were bought from a single retailer at an open fruit and vegetable market, and juice was obtained using a conventional home juice extractor (Braun MP80, Type 4290). Pomelos were manually peeled to remove the outer green layer. All other parts of the fruit were put into the juice extractor (full segments, seeds, white layer), and the juice was kept frozen at -20°C until use. Cranberry juice (containing glucose-fructose, concentrated cranberry juice, cranberry juice, water and ascorbic acid) obtained from the same lot was reconstituted from frozen concentrate (Ocean Spray, Lakeville – Middleboro, MA) on each dosing day.

Blood samples (3 mL) were collected in tubes containing EDTA before dosing and at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 16, 24 and 36 hours after dosing. Safety was assured by monitoring adverse events and vital signs before dosing and at 2 and 6 hours following drug administration.

4.3.3 *Determination of cyclosporine blood concentrations*

Cyclosporine A concentrations in whole blood were quantified using an LC/MS/MS method validated at MDS Pharma Services (Blainville, Quebec, Canada). Aliquots of 0.1 mL of human whole blood containing Cyclosporin A plus an internal standard (cyclosporine A-O-allyl-ether) were extracted using a liquid/liquid extraction with MTBE (methyl-ter-butylether). The extracted samples (5 µL) were then injected into an HPLC equipped with an API 3000 LC/MS/MS System. The column was a Prism RP, 5micron, 50x2.0mm. The mobile phase was composed of 80% acetonitrile/20% sodium acetate 25mM acidified with 0.5% acetic acid v/v. The flow rate was 0.350 mL/min isocratic. The overall chromatography time was 2.5 minutes, using different column lots and two different systems. The retention time of cyclosporin was 0.7 min (between 0.6-0.8) and the internal standard was 1.1 min (between 1.0-1.2). Chromatography conditions varied by less than 10% using different column lots and different systems. Quantitation was done by peak area ratio. The standard curve for Cyclosporine A was linear over the range of 5-

2 500 ng/mL. A weighted linear ($1/x$) regression analysis using the method of least squares was performed ($y = mx + b$). The correlation coefficient for Cyclosporin A was greater than 0.997. Extraction recovery was 88.9% at 15.0 ng/mL, 87.3% at 875 ng/mL and 85.7% at 1750 ng/mL. Stability was proven for 319 days in frozen human whole blood at -10°C or below, for three (3) freeze-thaw cycles, four (4) hours at room temperature in whole blood and for 48 hours in extracted samples at room temperature. The validated method showed that between-run precision and accuracy of Cyclosporine A measurements in five (5) batches ranged from 89.8% to 106.0% with a coefficient of variation (CV) of 9.6% or better. Within-run precision and accuracy evaluations showed that mean concentrations ranged from 96.0% and 107.3% with CV of 10.4% or better.

4.3.4 *Pharmacokinetic calculations*

The pharmacokinetic behavior of cyclosporine was analyzed by noncompartmental methods. The AUC from time 0 to the last measurable concentration (AUC_t) were calculated by the linear trapezoidal method. The apparent first-order terminal elimination rate constants (k_{el}) were calculated by linear least-squares regression analysis using at least 3 points in the log-linear terminal phase. k_{el} was not calculated and was set to missing when the cyclosporine blood concentration vs. time profile did not show a log-linear terminal phase. The AUC from time 0 to infinity (AUC_{inf}) was calculated as the sum of AUC_t plus the ratio of the last measurable blood concentration to k_{el} . The apparent first-order terminal elimination half lives ($t_{1/2}$) were calculated as $0.693/k_{el}$. The maximum blood cyclosporine concentration (C_{max}) and its corresponding time (t_{max}) were obtained for each individual by directly observing their blood cyclosporine concentration vs. time profile.

4.3.5 *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using SAS[®] general linear model (GLM) procedures. An analysis of variance (ANOVA) was performed on AUC_t, AUC_{inf} and C_{max} to test for similarity using the standard bioequivalence approach, i.e. with inverted null hypothesis

($H_0: \mu_1 \neq \mu_2$ and $H_1: \mu_1 = \mu_2$). Data were ln-transformed to account for the log-normal distribution of the data. The ANOVA model included sequence, regimen, and period as fixed effects, and subject nested within sequence as a random effect. Sequence was tested using subject nested within sequence as the error term. The comparisons of interest were pomelo juice vs. water and cranberry juice vs. water. The geometric means presented in Table 2 were obtained by exponentiation of the least square means (LSMs) resulting from the analysis of variance on the log transformed data. The 95% confidence intervals (CI) for the ratios of LSMs were calculated using the two one-sided test for bioequivalence [14]. A statistical difference was concluded when the 100% ratio was not included within the 95% CIs ($\alpha=0.05$). Clinical similarity, e.g. less than 20% different, was concluded if the 95% CIs completely lied within 80-125% ($\alpha=0.025$).

Statistical differences between regimens were also tested using the conventional null hypothesis ($H_0: \mu_i = \mu_j$ and $H_1: \mu_i \neq \mu_j$). The same ANOVA model described above was performed on log-transformed AUCt, AUCinf and Cmax. A Bonferonni adjustment was applied to the global alpha of 5% to account for multiplicity of the tests (2 different comparisons of interest). A difference between two regimens was therefore concluded if the p-value of the individual test was below or equal to 0.025.

4.5 Results

All 12 subjects completed the study. Only one adverse event (nightmare) was reported to be possibly related to the study drug or procedures. This subject had received cyclosporine with cranberry juice.

The results presented here are from the sample analysis of 12 subjects in all 3 periods. The mean blood cyclosporine concentration vs. time profile is shown in Figure 2. One value of kel could not be calculated and was set to missing because the cyclosporine blood concentration vs. time profile did not show a log-linear terminal phase. The corresponding AUCinf and $t_{1/2}$ were also set to missing for statistical analyses.

Pharmacokinetic parameters for the 3 regimens are provided in Table 1. The apparent terminal elimination phase was well characterized by sampling up to 36 hours, and the ratio AUC_t/AUC_{inf} was above 90% for all subjects. The t_{max} and t_{1/2} were similar for all treatments.

Results of the ANOVA are presented in Table 2. Pomelo juice increased the total exposure of cyclosporine by 19.4% for AUC_t, 18.9% for AUC_{inf} and 12.1% for C_{max}. Based on the 95% CI for ln-AUC_t, the two regimens (pomelo juice and water) were not similar since the 95% CI of 113.4-125.8% was outside the clinical acceptance criteria of $\pm 20\%$. In addition, all three variables showed a statistical difference between the two regimens, as the p-values were less than 0.025 for all three parameters.

On the other hand, cranberry juice did not significantly affect the pharmacokinetic behavior of cyclosporine. Although AUC_{inf} was shown to be statistically different, the difference in the ratios of LSMs was only 6.6%. The decreases in AUC_t and C_{max} were 5.0% and 4.8%, respectively but were not statistically different. All variables were judged not to be clinically different based on the 95% CIs that were all between 80-125%.

4.6 Discussion

Cyclosporine is incompletely absorbed after oral administration and its bioavailability is dependent on multiple factors such as the patient population, the formulation of cyclosporine and diet. Cyclosporine is extensively metabolized by CYP3A to numerous metabolites but the immunosuppressive activity of cyclosporine is mainly due to the parent drug [15]. The average AUC of cyclosporine has been reported to increase by 55% when administered with grapefruit juice compared with water in healthy volunteers [1] and by 38% (median) in renal allograft patients [2]. The interaction between cyclosporine and grapefruit juice occurs in the gut wall but not in the liver [16]. The presence of P-gp in the gut is also responsible for the variability observed in oral bioavailability of cyclosporine and the enhanced bioavailability seen with grapefruit juice [1, 17]. A significant amount of research has been done on the effect of grapefruit on drug disposition, but the exact compounds and the full mechanism responsible for this effect are not yet completely understood.

The calculated $t_{1/2}$ was similar for all regimens, a result that would suggest that pomelo juice would enhance the bioavailability of cyclosporine by inhibiting CYP3A and/or P-gp in the gut wall rather than in the liver. This effect would be consistent with that of grapefruit juice [16].

Some have reported that pomelo juice has a comparable inhibitory effect to grapefruit juice on CYP3A in human microsomes [3] and on the transport of digoxin by P-gp across Caco-2 cells [8]. In swine, cyclosporine's increased bioavailability was greater with pomelo decoction (water extraction by boiling) than with grapefruit decoction, 97% vs. 46%, respectively. In this study, we observed a 20% increase in the bioavailability of cyclosporine after administration with pomelo juice compared to the 55% observed after administration with grapefruit juice [1]. Grapefruit is thought to be a hybrid of pomelo and sweet orange [3, 8, 18], and pomelo juice shares common compounds with grapefruit juice. Furanocoumarins like 6',7'-dihydroxybergamottin are present in similar quantities in pomelo and grapefruit, but pomelo may have less bergamottin [3, 9]. It is generally hypothesized that the grapefruit juice effect does not result from only one compound but from the combination of a few of them and that this action may take place on different enzymes like CYP3A, P-gp and OATP [19].

Explaining the mechanisms underlying the different extent of effects of pomelo and grapefruit on cyclosporine is well beyond the scope of this study. However, it is interesting to present a quick overview of current knowledge on the grapefruit juice effect. Grapefruit juice administration decreases enterocyte CYP3A4 protein concentration, probably by a mechanism-based inactivation [20], but does not decrease the mRNA content [21]. This mechanism-based inactivation results in an irreversible inhibition process. As such, the inhibitory effect of a single glass of grapefruit juice is thought to completely disappear in approximately 7 days. [22, 23] This is why we planned this study with 14-day washout periods between treatment days. The main family of compounds thought to be responsible for CYP3A4 inhibition are furanocoumarins like bergamottin or 6',7'-dihydroxybergamottin [1, 3, 4, 19, 24-27] found in the peel and segments of the fruit [24]. Some furanocoumarins are also P-gp inhibitors in Caco-2 cells [26, 28], although the inhibition mechanism is somewhat different since grapefruit juice does not affect the P-gp protein concentration in the small intestine [21]. Flavonoids are another class of compounds

present in grapefruits, with naringin being the most abundant. Although flavonoids can inhibit CYP3A enzymes *in vitro* [29-31] and some of them (quercetin, kaempferol or naringin) exhibited an *in vitro* activity toward P-gp [6, 32-35], flavonoids are generally considered to play a minor role in the overall grapefruit juice effect *in vivo*. Although grapefruit and pomelo share a similar list of furanocoumarins and flavonoids, their different proportions could partly account for the lower increase in bioavailability of cyclosporine with pomelo juice.

Cranberry juice appears to have no significant interaction with cyclosporine either in the gut or in the liver. Cranberries, as well as other berries, are extensively studied for their potential medical benefits, particularly their antioxidant properties. Cranberries are known to have high flavonol content, as well as other phenolic products responsible for the antioxidant properties of various berries. Flavonols are a subgroup of flavonoid compounds including quercetin, kaempferol, myricetin and some others.[34] The exact content varies in the literature, but the main flavonols found in cranberries are quercetin and myricetin, which are mainly present as different glycoside conjugates [36-38]. It has been reported that free quercetin and free myricetin are almost absent from fresh cranberries and are generally present in significant amounts only after processing (for example juice making) [36]. However, free quercetin and myricetin were not detected in unhydrolyzed samples of commercially available cranberry juice and in fresh cranberry juice.[38] Once the samples are hydrolyzed, total quercetin is present at approximately 12 mg/L (40 μ M) in commercially available cranberry juice and at approximately 175 mg/L (580 μ M) in fresh cranberry juice. It would be difficult with current knowledge to predict the effect of fresh cranberries on the pharmacokinetics of cyclosporine at this point. Very little work on metabolism and drug transport has been done with cranberries. In general, *in vitro* studies are performed with isolated free compounds (e.g. quercetin) and results are sometimes conflicting. Quercetin is reported to be an activator [34, 35] but also an inhibitor of P-gp [32, 33]. However, an *in vitro* study using concentrations relevant for nutrition [39] investigated the inhibitory effect of selected flavonoids, including some glycoside conjugates, on the transport of talinolol across Caco-2 cells. It was found that 20 μ M quercetin and 100 μ M isoquercetin (quercetin-3-glucoside) inhibit talinolol transport across Caco-2 cells [39], but these two

compounds are among the least important flavonols found in cranberries.[36] Rutin (quercetin-3-rhamnoglucoside) is the second most important flavonol found in cranberries, [36] but it does not show any inhibitory potency.[39]

Cranberries have received much attention for their antioxidant properties, but very little information regarding drug interaction is available even though it is now a very popular beverage. In this study, cranberry juice did not affect the disposition of cyclosporine. The results of this study may therefore be very useful for patients receiving cyclosporine and possibly other compounds metabolized by CYP3A and transported by P-gp.

4.7 Conclusion

The interactions between drugs and food are complex as many transporters and metabolizing enzymes may be involved, with relative importance depending on each drug. It is important to look at these interactions carefully, especially for narrow therapeutic index drugs like cyclosporine. The prevailing incomplete understanding of fruit juices' effects on drug uptake and metabolism may not allow for reasonable predictions on drug disposition *in vivo* from *in vitro* data for now. Nevertheless, *in vivo* studies like this one are still essential at this point, since these interactions are complex and result from multiple juice constituents. The results of this study suggest that cyclosporine can be taken safely with a glass of cranberry juice. Although extrapolations can be dangerous, we may hypothesize that other compounds metabolized by CYP3A and transported by P-gp, like cyclosporine, may be safely administered with a glass of cranberry juice. However, patients undergoing cyclosporine therapy should be carefully monitored when they are consuming pomelo as it was shown to significantly increase the bioavailability of cyclosporine.

Acknowledgments and conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest.

4.8 References

1. Edwards DJ et al. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65(3):237-44
2. Bistrup C, Nielsen FT, Jeppesen UE, Dieperink H. Effect of grapefruit juice on Sandimmun Neoral absorption among stable renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(2):373-7
3. Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(7):766-71
4. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(1):14-23
5. Tian R, Koyabu N, Takanaga H, Matsuo H, Ohtani H, Sawada Y. Effects of grapefruit juice and orange juice on the intestinal efflux of P-glycoprotein substrates. *Pharm Res* 2002; 19(6):802-9
6. Romiti N, Tramonti G, Donati A, Chieli E. Effects of grapefruit juice on the multidrug transporter P-glycoprotein in the human proximal tubular cell line HK-2. *Life Sci* 2004; 76(3):293-302
7. Hou YC, Hsiu SL, Tsao CW, Wang YH, Chao PD. Acute intoxication of cyclosporin caused by coadministration of decoctions of the fruits of *Citrus aurantium* and the Pericarps of *Citrus grandis*. *Planta Med* 2000; 66(7):653-5
8. Xu J, Go ML, Lim LY. Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo. *Pharm Res* 2003; 20(2):169-76
9. Egashira K et al. Inhibitory effects of pomelo on the metabolism of tacrolimus and the activities of CYP3A4 and P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(8):828-33

10. Kanoko E et al. Pomelo-induced increases in the blood level of tacrolimus in a renal transplant patient. *Transplantation* 2003; 75(7):1057
11. Suvarna R, Pirmohamed M, Henderson L. Possible interaction between warfarin and cranberry juice. *Bmj* 2003; 327(7429):1454
12. Shields K. Possible cranberry and warfarin interaction. *Pharmacist's Letter/Prescriber's Letter* 2003; 19:#191103
13. Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* 1997; 73(1):67-74
14. Schuirmann DJ. A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *J Pharmacokinet Biopharm* 1987; 15(6):657-80
15. Company TME: Physicians' Desk Reference. 57 edition. Montvale, New Jersey; 2005
16. Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57(5):485-91
17. Lown KS et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(3):248-60
18. Barrett H, Rhodes A. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Syst Bot* 1976; 1(2):105-36
19. Dresser GK, Bailey DG. The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions. *Eur J Clin Invest* 2003; 33 Suppl 2:10-6
20. Schmiedlin-Ren P et al. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents: decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos* 1997; 25(11):1228-33
21. Lown KS et al. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; 99(10):2545-53

22. Di Marco MP, Edwards DJ, Wainer IW, Ducharme MP. The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: the role of gut CYP3A and P-glycoprotein. *Life Sci* 2002; 71(10):1149-60
23. Greenblatt DJ et al. Time course of recovery of cytochrome p450 3A function after single doses of grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74(2):121-9
24. Bailey DG, Dresser GK, Kreeft JH, Munoz C, Freeman DJ, Bend JR. Grapefruit-felodipine interaction: effect of unprocessed fruit and probable active ingredients. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(5):468-77
25. Eagling VA, Profit L, Back DJ. Inhibition of the CYP3A4-mediated metabolism and P-glycoprotein-mediated transport of the HIV-1 protease inhibitor saquinavir by grapefruit juice components. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(4):543-52
26. Ohnishi A et al. Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br J Pharmacol* 2000; 130(6):1369-77
27. Bailey DG, Dresser GK, Bend JR. Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(6):529-37
28. Dresser GK et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71(1):11-20
29. Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD. Grapefruit juice--felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 53(6):637-42
30. Rashid J, McKinstry C, Renwick AG, Dirnhuber M, Waller DG, George CF. Quercetin, an in vitro inhibitor of CYP3A, does not contribute to the interaction between nifedipine and grapefruit juice. *Br J Clin Pharmacol* 1993; 36(5):460-3

31. Miniscalco A, Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Eriksson UG. Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261(3):1195-9
32. Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen. *Pharm Res* 2001; 18(4):432-8
33. Shapiro AB, Ling V. Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1997; 53(4):587-96
34. Critchfield JW, Welsh CJ, Phang JM, Yeh GC. Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(7):1437-45
35. Phang JM, Poore CM, Lopaczynska J, Yeh GC. Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53(24):5977-81
36. Vvedenskaya IO, Rosen RT, Guido JE, Russell DJ, Mills KA, Vorsa N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *J Agric Food Chem* 2004; 52(2):188-95
37. Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkanen HM, Torronen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 1999; 47(6):2274-9
38. Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2001; 913(1-2):387-95
39. Ofer M, Wolfram S, Koggel A, Spahn-Langguth H, Langguth P. Modulation of drug transport by selected flavonoids: Involvement of P-gp and OCT? *Eur J Pharm Sci* 2005; 25(2-3):263-71

Table 1: Single-dose pharmacokinetics of cyclosporine administered with water, pomelo juice and cranberry juice in 12 healthy volunteers.

Parameters	Pomelo juice	Cranberry juice	Water
	Geometric mean (95% CI)	Geometric mean (95% CI)	Geometric mean (95% CI)
	Arithmetic mean (CV%)	Arithmetic mean (CV%)	Arithmetic mean (CV%)
AUC _t (ng·h/mL)	6449 (5686-7314)	5132 (4436-5936)	5400 (4745-6145)
	6566 (20%)	5261 (24%)	5501 (20%)
AUC _{inf} (ng·h/mL)	6705 (5886-7638)	5130 (4509-5836)*	5637 (4922-6458)
	6835 (21%)	5217 (19%)*	5753 (17%)
C _{max} (ng/mL)	1469 (1300-1661)	1248 (1127-1381)	1311 (1185-1450)
	1494 (19%)	1262 (16%)	1327 (17%)
AUC _t /AUC _{inf} (%) ¹	96 (1)	96 (1)*	96 (2)
t _{max} (h) ¹	1.4 (32)	1.6 (20)	1.3 (26)
k _{el} (1/h) ¹	0.069 (12)	0.065 (10)*	0.066 (17)
t _{1/2} (h) ¹	10 (11)	11 (10)*	11 (17)

1. Geometric means not calculated. * n=11

Table 2: Statistical comparison of selected pharmacokinetic parameters of cyclosporine between pomelo juice and cranberry juice treatments vs. water.

		AUC _t	AUC _{inf}	C _{max}
Pomelo juice vs. water	Ratio of geometric mean (%)	119.4	118.9	112.1
	95% CI	113.4-125.8 [#]	113.8-124.3	102.3-122.8
	p-value	0.0001*	0.0001*	0.0167*
Cranberry juice vs. water	Ratio of geometric mean (%)	95.0	93.4	95.2
	95% CI	90.3-100.1	89.2-97.8	86.9-104.3
	p-value	0.0527	0.0054*	0.2717

ANOVA was performed on the ln-transformed pharmacokinetic parameters

* Statistically different

Clinically different

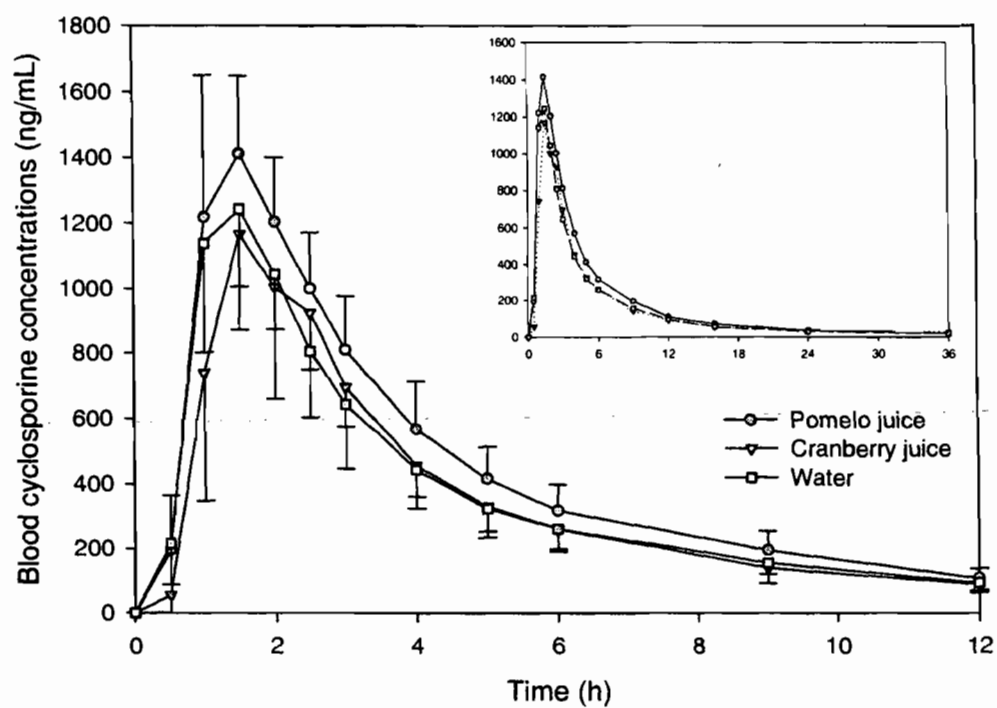


Figure 2: Cyclosporine mean blood concentrations in humans following a 200 mg dose of Neoral® 100 mg soft gelatin capsules, given with water, pomelo juice or cranberry juice in healthy volunteers. Error bars are indicating the standard deviation.

Chapitre 5

The Prediction of the Pharmacokinetics of Cyclosporine in Humans: is a Physiological Modeling Approach Worth the Trouble vs Allometry

**La prédiction de la pharmacocinétique de la cyclosporine chez
l'humain: l'approche physiologique vaut-elle tous les efforts par
rapport à l'approche allométrique**

Manuscrit à être soumis dans Clinical Pharmacokinetics

5.1 Préambule à la modélisation physiologique de la pharmacocinétique de la cyclosporine et comparaison avec l'allométrie

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse visait à comparer différentes techniques de modélisation dans le but d'identifier dans quelles situations elles conviennent le mieux. Les deux premières techniques de modélisation comparées sont l'allométrie et la modélisation physiologique dans le contexte du passage de l'étape pré-clinique à l'étape clinique du développement d'un médicament. Afin de comparer ces deux techniques, la cyclosporine a servi de médicament modèle et les données de cyclosporine obtenue avec l'étude d'interaction présentée au chapitre précédent, vont nous servir à cette fin.

Un des nombreux défis rencontrés dans le développement d'un médicament est la prédiction de la pharmacocinétique chez l'humain. La biodisponibilité est un des paramètres les plus complexes à prédire, surtout lorsqu'il y a présence de métabolisme et de transport au niveau intestinal. Les modèles physiologiques permettent en théorie de prédire la biodisponibilité mais ces modèles sont complexes à élaborer. Nous avons néanmoins construit un modèle d'absorption intestinale pour la cyclosporine qui tient compte du métabolisme et du transport intestinal.

Modéliser l'absorption intestinale ne suffit pas à obtenir un profil de concentrations sanguines. On doit également décrire comment le médicament est distribué, métabolisé et éliminé. Des modèles physiologiques décrivant la pharmacocinétique de la cyclosporine chez le rat et chez l'humain suivant une administration intraveineuse avaient déjà été publiés dans la littérature [1-4]. Le plus approprié de ces modèles a été sélectionné et reproduit (voir la section 5.4.2.1 pour les détails) afin d'y lier le modèle d'absorption [2]. Le modèle sélectionné avait d'abord été développé chez le rat. Un profil de concentrations de cyclosporine avait été obtenu pour chaque organe inclus dans le modèle et c'est à partir de ces profils que les paramètres décrivant la distribution ont été obtenus. Les paramètres équivalents pour le modèle humain ont par la suite été obtenus par allométrie.

Avant d'ajouter la partie du modèle décrivant l'absorption intestinale, il fallait s'assurer que le modèle utilisé suivant une administration IV était bien reproduit. Les simulations ont d'abord été faites pour une administration IV chez le rat. La Table 1 présente une comparaison des surfaces sous la courbe obtenues de façon expérimentale [2] ou simulée.

Organe	AUCt* (expérimental)	AUCt* (simulation)	%diff
Sang veineux	32.4	46.9	31
Poumon	176.4	310.1	43
Rate	248.8	397.2	37
Foie	355.56	201.1	-77
Os	90.8	93.7	3.1
Muscle	55.7	65.32	15
Cœur	120.9	220.1	45
Rein	231.6	307.9	25
Intestin	146.7	162.0	9.4
Peau	112.2	173.2	35
Gras	296.2	379.4	22
Thymus	210.8	338.0	38
Demi-vie (h)	9.2	17.0	85

*Les AUCt sont en $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$.

Table 1: Comparaison des valeurs simulées et expérimentales d'AUCt (0-32h) pour une Dose de 5.9 mg/kg de cyclosporine donnée en infusion de 2 minutes chez un rat de 250 g.

On voit que le modèle prédit des concentrations inférieures pour le foie au profit des autres organes pour lesquels les concentrations simulées sont supérieures à celles mesurées. Cependant, on peut considérer que le modèle reproduit les profils de concentrations dans le sang et les organes de façon raisonnable. Des prédictions à l'intérieur d'un facteur de deux

sont généralement considérées comme étant acceptables dans le domaine des modèles prédictifs. Le modèle a donc été conservé pour faire les prédictions chez l'humain.

Dans l'article qui suit la présente section, le lecteur verra qu'une fois le modèle mis à l'échelle humaine, les prédictions sont moins satisfaisantes que chez le rat. Le modèle présente certaines difficultés à reproduire la phase de distribution du profil de concentrations sanguines suivant une administration intraveineuse. Toutefois, comme il s'agissait dans le présent travail d'évaluer un modèle d'absorption dans le but de prédire la biodisponibilité chez l'humain, ce modèle de distribution/métabolisme/élimination a été conservé. Le seul ajout fut la présence de métabolisme extrahépatique.

À titre informatif et sans entrer dans les détails, il est intéressant de montrer les profils de concentrations sanguines obtenues par des modèles de distribution tissulaire plus simples (Figure 1). Le modèle utilisé dans l'article présenté dans le présent chapitre décrit la distribution tissulaire comme était limitée par la perméabilité des tissus de façon linéaire. Nous avons également testé deux modèles avec une distribution tissulaire limitée par la perfusion aux tissus. Un des deux modèles utilisait des constantes de partage déterminées expérimentalement chez le rat [4] alors que l'autre modèle à distribution tissulaire limitée par la perfusion utilisait des constantes de partage théoriques (voir section 2.2.3 aux pages 37-38 pour une brève description des modèles génériques) [5, 6]. Le quatrième modèle testé est un modèle mixte. Une distribution tissulaire limitée par la perfusion était utilisée pour les organes dont les concentrations semblaient en équilibre rapide avec le sang d'après les profils de concentrations chez le rat (poumon, rate, cœur, reins et foie) [2]. Les autres organes conservaient le modèle de distribution tissulaire limitée par la perméabilité. La Figure 1 (page suivante), des simulations de profils de concentrations sanguines de cyclosporine suite à une administration intraveineuse d'une dose de 175 mg, infusée sur 3h chez un adulte de 70 kg. Pour une telle dose on s'attend à une concentration moyenne maximale aux alentours de 2.2 ng/mL [7]. On voit donc sur la Figure 1 que le modèle dans lequel la distribution est limitée par la perméabilité pour tous les organes demeure le meilleur.

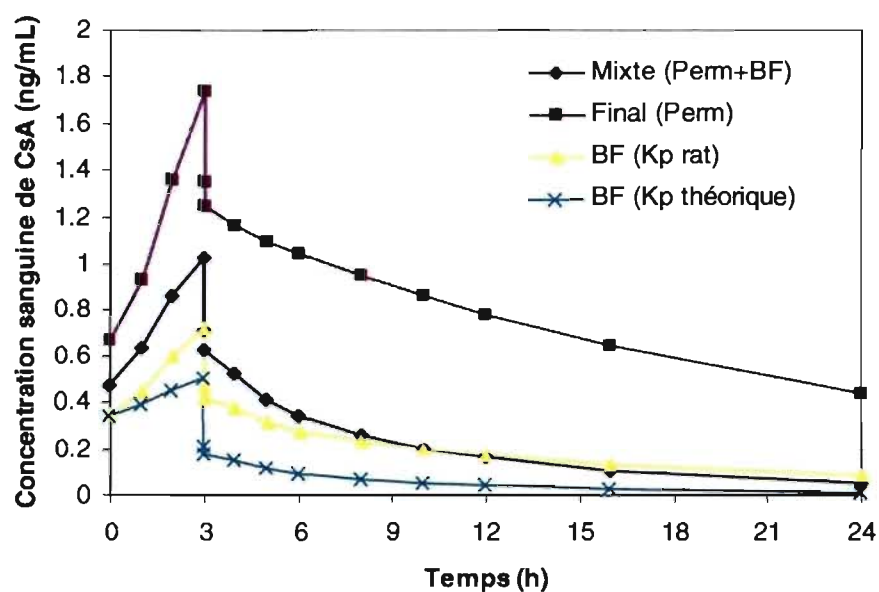


Figure 1: Simulation des profils de concentrations sanguines de cyclosporine (CsA) suite à une administration intraveineuse d'une dose de 175 mg, infusée sur 3h chez un adulte de 70 kg selon quatre modèles de distribution tissulaire physiologiques. Perm = limité par la perméabilité tissulaire; BF = limité par la perfusion des tissus; Kp = constante de partage;

**THE PREDICTION OF THE PHARMACOKINETICS OF CYCLOSPORINE IN HUMANS: IS A
PHYSIOLOGICAL MODELING APPROACH WORTH THE TROUBLE VS ALLOMETRY**

Julie Grenier^{1,2}, Jacques Turgeon², Murray P. Ducharme^{2,3}

1. MDS Pharma Services, Montreal, Canada

2. Faculté de Pharmacie, University of Montreal, Montreal, Canada

3. Allied Research International, Toronto, Canada

Correspondance and offprints: Murray P. Ducharme, Vice President, Scientific and
Regulatory Affairs, Allied Research International, 4520 Dixie Road, Mississauga,
Ontario, Canada, L4W 1N2



5.2 Abstract

Background and objectives: Allometry is a traditional scale-up method from animal data to humans. It has the advantage of being mathematically simple, requiring minimal computation and can be successful in a lot of cases. However, allometric predictions for drugs eliminated by metabolism or that are substrates of transporters are generally poor and, in such cases, animal bioavailability bears a weak correlation with human bioavailability (F). On the other hand, scale-up from *in vitro* data and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling have more physiological grounds and can integrate knowledge gained through the drug development process. However, the use of full PBPK models is not so common mainly because it requires a lot more data inputs and computation efforts. In fact, PBPK modeling can theoretically be as sophisticated as we want it to be but in reality, the model is limited by the type of data available. The intent of the present work was to compare the predictive ability of allometry and a whole-body PBPK model for the specific case of cyclosporine, a drug that is subject to metabolism and active transport, two factors often leading to poor allometric predictions. Physiological modeling of the tissue distribution of cyclosporine has been extensively studied previously in the literature and one of the proposed models was used as a starting point for the modeling of cyclosporine absorption from the gut.

Methods: The two pharmacokinetic parameters of interest for allometric scaling of cyclosporine were the systemic clearance (CL_s) and the total volume of distribution (V_{ss}). Extrapolations were made from mice, rats, rabbits and dogs data using body weight, body surface area, maximum lifespan potential and brain weight as correction factors added to the scaling factors, following the rule of exponent. This later is based on the results of a first extrapolation done by simple allometry, i.e. with body weight. The starting point of the PBPK model was a distribution model taken from the literature for intravenous (IV) administration. This model takes into account the nonlinear binding of cyclosporine to erythrocytes and considers the distribution of cyclosporine to be limited by permeability of the organs, except for the liver and the lungs. We then considered the addition of extrahepatic metabolism to this model, still following IV administration. The model was brought one step further by adding an absorption model suitable

for oral administration of cyclosporine. The absorption model takes into account the gut wall metabolism and active transport of cyclosporine. The perfusion of the intestine was modeled with a segregated blood flow model. Modeling of the transport processes at the enterocyte level was done based on compartmental analysis of Caco-2 cells experiments data from the literature. The metabolic clearance in the hepatocytes was estimated based on *in vitro* data from the literature and the metabolic clearance in the enterocytes was extrapolated from the hepatocytes data. In addition, the transit of the drug molecules through the small intestine was described with a linear first-order process occurring between 7 segments of the small intestine. Finally, a sensitivity analysis was performed for different parameters of the absorption model.

Results: Based on the rule of exponent method, brain weight correction should be used. This method underpredicts CL_s of cyclosporine by at least 72% and the V_{ss} by at least 58%, but this is an improvement from simple allometry. For the PBPK modeling, the original distribution model failed to be reproducible when scaling up to man, although the model could be reproduced in rats. The addition of extrahepatic metabolism improved the prediction made from the model following IV administration. The intestinal absorption model we developed resulted in a predicted bioavailability of 22.4% for cyclosporine following a 200 mg oral dose. In the sensitivity analysis, the surface of absorption was the most critical parameter with the more direct effect on cyclosporine blood concentrations but other parameters had an important effect on the predicted concentrations.

Conclusion: For cyclosporine, the best prediction for CL_s and V_{ss} was achieved with allometric scaling using MLP as a correction factor but there is no *a priori* rationale to use this correction factor. With the rule of exponent, the brain weight would be used as a correction factor but this method is not better than more physiological approaches. For drug bioavailability, a more mechanistic approach seems a superior approach. We have presented an absorption model from the gut that integrates both drug metabolism and drug transport from which we obtained a reasonable value for F . Physiological approaches will need further development before their use becomes optimal in the drug development process. However, these approaches have the potential to evolve as more discoveries are made on physiology, metabolism and transport.

5.3 Introduction

A lot of research is being done in order to evaluate and improve scale-up approaches from *in vitro* and animal data to human and yet, there is no universal method. Allometry is certainly the most traditional scale-up method from animal data. Allometry assumes that differences between species are due to differences in body sizes. It has the advantage of being mathematically simple, requiring minimal computation and can be successful in a lot of cases. Allometric scaling has been more often successful for the prediction of renal clearance when it is tightly correlated with glomerular filtration rate [8, 9]. However, allometric predictions for drugs eliminated by metabolism or that are substrate of transporters are generally poor and animal bioavailability bears a weak correlation with human bioavailability [10]. Metabolic enzymes and transporters such as CYP3A enzymes and P-gp are expressed differently between animal species, both qualitatively and quantitatively, which makes it more unlikely for allometry to be successful because of its more empirical grounds. On the other hand, scale-up from *in vitro* data and physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling have more physiological grounds and can integrate knowledge gained through the drug development process. However, the use of full PBPK models is not so common mainly because it requires a lot more data inputs and computation efforts. Some studies have assessed the relative performance of different techniques for specific types of prediction made for hepatic clearance [11-16], volume of distribution [5, 6, 12, 17-19] or bioavailability [12, 20-22]. Few generic PBPK models for rats and humans were evaluated for different series of compounds [23-26] but not many studies have been published to compare the predictive ability of both allometric scaling and full PBPK modeling in order to predict the overall pharmacokinetics in humans [27].

The intent of the present work was to compare the predictive ability of allometry and a whole-body PBPK model for the specific case of cyclosporine. Cyclosporine is a well known substrate of CYP3A and P-gp, which both contribute to the observed variability in the extent of absorption. Cyclosporine is a hydrophilic neutral drug with low hepatic extraction ratio (~0.2) that is almost completely eliminated by metabolism [28]. We wanted to compare the potential benefits of using physiologically based pharmacokinetic modeling (PBPK) versus the more classical

approach of allometric scaling for a drug that is subject to metabolism and active transport, two factors often leading to poor allometric predictions. Cyclosporine was also a good candidate because of the abundance of data available in the literature.

Physiological modeling of the tissue distribution of cyclosporine has been extensively studied by Malcolm Rowland and his colleagues. They first developed an isotherm describing the binding of cyclosporine in erythrocytes [29]. Several physiologically based models were then developed for intravenous administration in rats [1-4, 30] and some were extrapolated to man [2, 4]. One of the proposed models was used as a starting point for the modeling of cyclosporine oral absorption [2].

5.4 Methodology

5.4.1 Allometric scaling

Allometric scaling was performed using different correction factors, all well described by I. Mahmood [9]. We first used simple allometry with the following equation:

$$P = a * BW^b \quad (1)$$

where P is the pharmacokinetic parameter of interest, 'a' is the allometric coefficient, 'b' the allometric exponent and BW is the body weight.

The 'rule of exponent' approach proposed by Mahmood and Balian for clearance (CL) extrapolation suggests that if the exponent of the simple allometry is between 0.55 and 0.70, then simple allometry should be suitable to make the prediction for humans. If however the exponent of simple allometry is between 0.71 and 0.99, then a correction with the maximum life span potential (MLP) is the most appropriated approach.

$$P * MLP = a * BW^b \quad (2)$$

If the exponent of the simple allometry is above 1 then the brain weight (BrW) should be used as a correction factor.

$$P * BrW = a * BW^b \quad (3)$$

For allometric exponent below 0.55 or above 1.3, predictions are usually poor. In addition, allometric scaling was also performed using body surface area (BSA) instead of body weight for simple allometry.

$$P = a * BSA^b \quad (4)$$

The pharmacokinetic parameters of interest are systemic clearance (CL_s) and the steady-state volume of distribution (V_{ss}). Animal data were taken from the literature, all following intravenous (IV) administration. Two sets of data were found for cyclosporine in mice [31, 32], two sets of data with rats [4, 33], two sets of data for rabbits [33, 34] and one data set for dogs [33]. In all these animal studies, cyclosporine was measured in whole blood by immunoassays. The BSA was calculated by the following equation [9]:

$$BSA = k * BW^{2/3} \quad (5)$$

where k is the shape factor. The shape factor, BrW and MLP were taken from reference [9] and values used are presented in Table 2.

Animal values for CL_s and V_{ss} were plotted on a log-log scale against the different factors described in equations 1-4 and linear regressions were performed to determine the allometric parameters a and b. Although the rule of exponent has not been ruled out for the prediction of V_{ss} and would not have any physiological basis, the predictions were made with all four equations to compare them for the specific case of cyclosporine.

5.4.2 PBPK modeling: extrahepatic metabolism

5.4.2.1 Initial model – without extrahepatic metabolism

Among the few PBPK models proposed by Rowland and Kawai, the linear distribution model (LD model) was chosen as a base model for the work presented here [2]. Their first model assumed perfusion-rate limited distribution into tissues and each tissue was considered a well-stirred compartment [4]. Further work revealed that this was not the best way to describe the

distribution of cyclosporine. They then evaluated if the intracellular binding would be best described by a linear model or nonlinear model [2]. The linear model well described the observed pharmacokinetics in rats and seemed to be applicable to human scale-up. The nonlinear model did not offer any significant improvement in the description of cyclosporine distribution. Ultimately, four different models were tested for each organ in rats, one being specific for the brain, and the best one was chosen for each based on AIC criterion [1]. However, this model was judged too complex for the purpose of our work and some of the parameters needed were difficult to scale-up to humans. Therefore, the LD model was chosen as the starting point for the present work.

For all details regarding the PBPK LD model of cyclosporine, the reader is referred to the original article [2]. However, for the sake of clarity, a brief description of the model developed in rats will be given. The model first divides blood into plasma and erythrocytes compartments. Binding to erythrocytes is described by a saturable isotherm defined by a number of binding sites (nP_T), a dissociation constant ($K_{D,bc}$) and a permeability coefficient (PS_{bc}). The drug transfer to tissues first occurs between plasma and interstitial fluid through an instantaneous equilibrium of the free concentrations of drug (with free fraction fu_P for plasma and fu_I for interstitial fluid). The drug transfer from the interstitial fluid to the tissue cells is then described by a permeability coefficient (PS_{TC}). Once within the tissue cells, the drug is considered to be in a reservoir where the free concentration (with free fraction fu_T) equilibrates rapidly but where there is also a 'slowly equilibrating' pool where the drug can bind with first-order rate constants of association (k_{ass}) and dissociation (k_{dis}). In this model, metabolism occurs only in the liver. The concentration vs time profile of cyclosporine within each organ in rats was fitted to obtain the values of PS_{TC} , fu_T , k_{ass} and k_{dis} for each tissue while other physiological parameters were fixed. Organs are then connected to each other through blood circulation. For scale-up to humans, fu_P , fu_I , fu_{TC} , nP_T , $K_{D,bc}$, PS_{bc} , k_{ass} and k_{dis} are considered to be constant per unit of volume in mammals. The different values of PS_{TC} were extrapolated to man by allometric scaling with a single point estimate (rat value) using a fixed exponent of 1.

5.4.2.2 Extrahepatic metabolism for IV administration

The simulated pharmacokinetic profile of cyclosporine in rats (in blood and organs) could be well reproduced for the LD model. The scale-up to human with the above methodology seems to work well with the data set it was originally compared to [35]. However, when we performed other simulations to apply the model to other sets of experimental data [7, 36, 37], the simulated and experimental pharmacokinetic profiles did not match so well (data not shown). It is expected that different sets of clinical data will give different concentration vs time profiles, especially for a highly variable drug like cyclosporine. Two major observations were made regarding the performance of the PBPK model. Overall, it underestimated the average C_{max} but the difference was within 30%, which can be considered acceptable for this kind of modeling considering the number of assumptions and the complexity of the model. The main problem appears to be with the distribution phase of the profile. The simulated concentrations do not decrease fast enough as compared to the observed values.

One thing that was not explored in the original model was the extrahepatic metabolism of cyclosporine. We therefore added a metabolic clearance at the intestine level. Different intestinal extraction ratios (E_G) were used for the simulations and values were chosen with the following rationale. Bioavailability (F) can be described by the following equation:

$$F = F_A \times F_G \times F_H \quad (6)$$

Where F_A is the fraction of the dose absorbed from the gut lumen, F_G is the fraction of the absorbed dose that is not metabolized by the gut wall and F_H is the fraction of the dose reaching the portal vein that is not metabolized on the first-pass through the liver. We first assumed that $F_A = F_G = F_H = 0.8$ which would give a reasonable estimate of $F = 51\%$ [7, 38]. Considering that the gut receives approximately 25% of the total cardiac output, it can be approximated that a maximum of 25% of gut metabolism can still occur through systemic circulation, corresponding to an E_G of 0.05. Clearance can be defined with the following equation:

$$CL_G = E_G \times Q_G \quad (7)$$

with Q_G being the blood flow rate reaching the gut, 66 L/h, resulting in a CL_G of 3.3 L/h. The hepatic clearance (CL_H) was then readjusted to take into consideration that the systemic clearance (CL_S) is the combination of both hepatic and intestinal metabolism.

$$CL_S = CL_H + CL_G \quad (8)$$

Following IV administration, CL_S is 19.02 L/h [7], therefore giving a CL_H of 15.72 L/h. The same calculations were done for E_G of 0.025, 0.01 and 0.005. Finally, the gut intrinsic clearance ($CL_{int,G}$) is the parameter used in the differential equation of the model and was calculated as follow considering a free fraction in blood (f_{u_B}) of 0.048:

$$CL_{int,G} = \frac{Q_G * CL_G}{f_{u_B}(Q_G - CL_G)} \quad (9)$$

The term added to the differential equation describing the rapidly equilibrating pool of the gut tissue was:

$$CL_G = CL_{int,G} \cdot C_G \cdot f_{u_G} \quad (10)$$

Simulations were done for doses of 4 mg/kg given as an IV infusion over 2.5h and 2.5 mg/kg over 3h, in a 70kg adult.

5.4.3 PBPK modeling: absorption model

The idea was then to go further with the PBPK modeling of cyclosporine by adding gut wall metabolism and transport for oral drug administration. The parameters used to model the absorption process across the gut wall were determined as described in the following sections. A schematic representation of the absorption model is given in Figure 3.

5.4.3.1 Fraction absorbed consideration

The Neoral® formulation of cyclosporine is a microemulsion that was developed to increase the solubility of the drug, which is hydrophobic of nature. In a HCl solution medium, more than 90% of the drug is released and dissolved within 15 minutes [39]. The use of water medium for

dissolution testing was shown to be lower and slower than in a simulated intestinal fluid [40]. In addition, Wu et al. have estimated that the fraction absorbed from the microemulsion formulation of cyclosporine is on average 86% [38]. This makes it likely that the absorption of cyclosporine is not limited by dissolution but more by the permeability and active transport through the gut wall. It was therefore considered for modeling purposes that 100% of the dose administered orally was available for absorption in the small intestine.

5.4.3.2 Segregated blood flow model for intestinal perfusion

Drug metabolism in the intestine is often considered negligible compared to hepatic metabolism from the systemic circulation but is of crucial importance when it comes to drug absorption from the gut lumen, especially for CYP3A substrates like cyclosporine. In the intestine, CYP3A enzymes are present almost exclusively in mature enterocytes, therefore present mainly at the villus tips [41]. Intestinal P-glycoprotein transporters are located in the brush border membrane of the apical surface of the enterocytes [42, 43]. Therefore, only a small portion of the intestine tissues is considered to be responsible for drug metabolism and secretion back into the gut lumen. A segregated-flow model has been proposed to account for the route of administration dependence of intestinal metabolism [44, 45]. In this model, the intestinal blood flow is divided in two. A fraction of the intestinal blood goes to the enterocytes (or mucosa) layer where drug metabolism and transport occur. The other fraction of intestinal blood flow is directed toward non-eliminating intestinal tissues (sub-mucosa and muscularis layers). The fraction of blood volume going to the enterocytes (f_{ent}) is not known with exactitude and has been reported to be between 5-30%. In the original publication of this model, a value of 10% was used initially for simulation but a value of 2.4% was obtained by fitting a morphine experiment on rat small intestine [44]. The intestinal blood flow and volume used in the model are the ones of the whole intestine (small intestine + colon) but the absorption is considered to occur only in the small intestine. Therefore, it is unlikely that f_{ent} would reach a value as high as 30% and it was judged preferable to explore the behavior of the model at lower values. An initial value of 2.5% was initially used here. A set of simulations using f_{ent} values ranging from 0.25%

to 15% was then performed to look at the sensitivity of the model to this parameter and seek for its relative importance compared to other parameters. The fraction of volume for the enterocytes relative to the whole intestinal tissue was considered to be the same as the fraction of intestinal blood flow, i.e. f_{ent} .

For the non-eliminating layers of the intestine, the PBPK model was kept the same as previously described in the '*initial model*' section. For the enterocytes, the parameterization was done based on data from Caco-2 cells transport experiment and the metabolic clearance was estimated from *in vitro* data as described in the following sections. Note that all values for simulations are standardized for a 70kg adult.

5.4.3.3 Transport in Caco-2 cells modeling

Caco-2 cells are being used extensively for transport experiments as an *in vitro* model for gut wall permeability of drugs. Typically, the apical to basal flux (J_{A-B}) and the basal to apical flux (J_{B-A}) are determined and compared. If J_{B-A} is greater than J_{A-B} , it is concluded that the drug is a substrate for active transport. The simple values of J_{A-B} and J_{B-A} usually reported in the literature were not suitable for our purposes since metabolism by CYP3A enzymes occurs within the enterocytes. For a P-gp substrate such as cyclosporine, we have to take into consideration both active and passive transport. Passive transport occurs through simple diffusion following the concentration gradient (ΔC) and the associated flux (J_{diff}) is described by the Fick law:

$$J_{diff} = P_{diff} \cdot \Delta C \quad (11)$$

where P_{diff} is the permeability coefficient. The flux associated to active transport (J_{efflux}) can be described by a J_{max} model.

$$J_{efflux} = \frac{J_{max} \cdot C}{K_m + C} \quad (12)$$

where J_{max} is the maximum flux and K_m is the concentration needed to reach half J_{max} .

The concept has been used in the past by Fricker for cyclosporine but was applied to J_{A-B} and the permeability coefficient represented the permeability across the whole Caco-2 cells [46].

In order to distinguish between the permeability of the apical side from the permeability of the basal side of the Caco-2 cells system, compartmental analysis was applied to the apical-to-basal (A-B) and the basal-to-apical (B-A) transport experiments reported by Fricker [46]. A schematic representation of the compartmental model is presented in Figure 2 and the differential equations used to describe the system are presented in Appendix A. There were 9 concentration-time data points for each transport experiment (A-B and B-A). The volumes of all 3 compartments are known as well as the concentrations in the apical and basal compartments. In order to estimate the volume of the Caco-2 cells, an average cell height of 19 μm was used [47] resulting in an approximate volume of 2×10^{-3} mL.

5.4.3.4 Transport in intestinal tissue – Scale-up from Caco-2 cells system

Two factors have to be considered to scale-up the transport parameters obtained from Caco-2 cells to the intestine: the relative expression of P-gp transporter between the 2 systems and the effective surface of absorption in the human small intestine. The expression of P-gp transporters in Caco-2 cells can be considered to be representative of the expression in the human small intestine [48-51]. Moreover, P-gp expression tends to increase from the duodenum to distal ileum and Caco-2 cell systems would be more indicative of the proximal small intestine [51]. For the absorption model built throughout the current work, it was assumed that P-gp transporters were expressed equivalently between the Caco-2 cells systems and the whole human small intestine.

The second consideration for the scale-up of Caco-2 cells parameters is the effective absorption surface in the small intestine, which is among the most difficult parameter to estimate in an absorption model. Caco-2 cells cultured on a filter spontaneously form a monolayer with a well defined brush border on the apical surface and tight cellular junctions, all of which made them so popular as a model for intestinal permeability [47]. The small intestine has a length between 3 and 3.8 m and a radius of approximately 1.75 cm [52-54]. If the small intestine is considered as a simple tube, it represents a surface of 3300-4170 cm^2 . However, this surface can be multiplied by a factor of 3 when considering the folds of the intestinal tissue, increasing

the small intestinal surface to 9900-12 500 cm². Now multiplying by another factor of 10 to take into account the villi folds, the estimated surface can be up to 125 000 cm². Beyond that, we don't need to consider the amplification factor of the microvilli since the Caco-2 cells also have the same morphology at that level. Cyclosporine has a permeability coefficient in the order of 2×10^{-6} cm/s [55], which is considered to be a highly permeable drug ($P_{app} > 1 \times 10^{-6}$ cm/s) [56]. For such drugs, some authors have hypothesized that the absorption is rapid and occurs at the villi tips, the drug molecules not having the time to diffuse in the villi crypt, therefore limiting the effective surface area to something closer to the tube [56, 57]. Considering the surface of the 'folded tube' with a length of 3.5m, an initial value of 11 550 cm² was used. A series of simulations were done with different values of surface from 3850 cm² up to 20 000 cm² to test the sensitivity of the model to this parameter.

5.4.3.5 Segmentation of the intestine

Now to describe the transit through the small intestine, we considered that the drug molecules transit from one segment of the small intestine to another by a linear first-order process. This way, the drug present in the gut lumen has access only to a fraction of the total absorption surface of the lumen, whereas the drug coming back to the enterocyte layer through the systemic circulation has access to the whole small intestine. For the sake of simplification, all segments were considered to have the same volume and flow rate. Previous work have suggested that a number of 7 segments is optimal to describe the transit process [54]. A mean small intestinal transit time (t_{tr}) of 199 min for the small intestine reported by the same authors was used [54]. The transit was parameterized as a flow (Q_{tr}) equal to 1015 mL/h, calculated as the small intestinal volume (3367 mL for a tube with a radius of 1.75 cm and a length of 350 cm) divided by the mean transit time.

Additional simulations were performed to look at the sensitivity of the model to the intestinal transit time. However, instead of using few specific values of Q_{tr} , a population simulation was done since an estimation of the variability around the mean t_t was available in the literature. Yu et al. collected and compiled 400 human small intestinal transit time data and obtained a CV of

39% around the mean of 3.317 h [54]. The normality or log-normality of the distribution for the small intestine transit time could not be concluded. However, a normal distribution was assumed to perform the population simulation. The variance on Q_{trs} (σ_Q^2) was calculated from the variance on t_{trs} ($\sigma_t^2=1.673$) based on the following relationship [58]. Let Q_{trs} be denoted by $f(t_{trs})$.

$$f(t_{trs}) = \frac{V_{SG}}{t_{trs}} \quad (13)$$

where V_{SG} is the volume of the small intestinal lumen (3367 mL). Then

$$Var(f(t)) = (f'(\mu_t))^2 \sigma_t^2 - (f''(\mu_t))^2 \frac{\sigma_t^4}{4} \quad (14)$$

where μ_t is the mean of t_{trs} , f' and f'' are the first and second derivatives of f , respectively.

Therefore, Q_{trs} was described with a mean of 1015 mL/h and variance σ_Q^2 of 132852 (corresponding to a CV of 36%).

5.4.3.6 Rationale for the intrinsic hepatic clearance values used

In the context of drug development where PBPK modeling would be performed at an early stage before getting any human data, we were interested to see how such a model would perform with current knowledge on drug metabolism. Ideally, one would want to predict the intrinsic clearance based on *in vitro* data only. An initial value of 276 L/h for $CL_{int,H}$ was used. This value was calculated with equation 9 based on a hepatic blood flow (Q_H) of 99 L/h and a hepatic clearance of 11.7 L/h reported from *in vitro* data from the Simcyp Clearance and Interaction Simulator®. This later is a tool designed to implement *in vitro-in vivo* extrapolations taking into considerations human physiological, anatomical, genetic and epidemiological information with human *in vitro* data in order to predict population distributions of pharmacokinetic parameters. A 95% confidence interval (CI) can also be provided for the clearance prediction. For cyclosporine, the 95%CI around the mean of 11.7 L/h is 9.7-25.2 L/h

[59]. With the data provided, it was not possible to calculate the corresponding variance that would have permit to perform a population simulation. Two simulations were done using the 95%CI boundaries. Translated in terms of $CL_{int,H}$, these boundary values are 224-704 L/h. More standard procedures using *in vitro* data from hepatocytes resulted in a predicted $CL_{int,H}$ of 56.5 L/h [14], which underestimate the observed intrinsic clearance even more then allometric scaling based on animal data only. Based on the rule of exponent mentioned earlier in the allometric scaling section above, the extrapolated systemic clearance would be 4.2 L/h, which corresponds to a $CL_{int,H}$ of 91.4 L/h. These last two predictions being very low anyway, a single value of 100 L/h was used for the simulation. For comparison, the value of intrinsic hepatic clearance ($CL_{int,H}$) based on the observed systemic clearance (CL_s) found in the literature was also used for simulation. With a systemic clearance of 19.02 L/h [7], ($CL_{int,H}$) is 490 L/h.

5.4.3.7 Intestinal intrinsic clearance determination for the oral absorption model

There was no available *in vitro* data for intestinal microsomes or enterocytes in the literature for cyclosporine. An indirect way to estimate the $CL_{int,G}$ was therefore used. For other drugs, there is a good correlation between the content in CYP3A4 enzymes and the maximum rate of metabolism in hepatocytes and enterocytes [60]. We assumed that CYP3A enzymes in the liver and in the gut metabolize cyclosporine in the same way and that differences in CL_{int} are only due to differences in the number of enzyme units, i.e. that there is no differences in the availability of cofactors. The total abundance of CYP3A in the small intestine is estimated to be around 65-70 nmol and a value of 65.7 nmol was used [60-62]. This represents only 0.83% of the estimated abundance of CYP3A in the liver, 7920 nmol [62]. These are of course estimates of average values and it is known that the contents in CYP3A enzymes in the gut and in the liver are variable and are not co-regulated within individuals [60, 63]. Therefore, $CL_{int,G}$ is estimated to be 0.83% of each used $CL_{int,H}$. The $CL_{int,G}$ initial value was 2.29 L/h based on the predicted $CL_{int,H}$ of 276 L/h. For the sensitivity analysis, a first set of simulations was performed with a $CL_{int,G}$ paired to each $CL_{int,H}$ cited in the previous section. A second set of simulations was performed by keeping the $CL_{int,H}$ constant at the initial 276 L/h value and by using $CL_{int,G}$ of 0.53,

1.8, 2.9 and 4.1 L/h. These values were chosen based on the reported CYP3A content of duodenal pinch biopsies obtained from 93 healthy volunteers [64]. From their data, the authors reported that the relative duodenal CYP3A4 content expression values varied by 8 fold. A rough estimate of the 25% and 75% quartiles were made from their box plot and were estimated to be approximately ± 1.25 times the mean and median content. A first set of values for $CL_{int,G}$ was therefore calculated as ± 1.25 times the mean value of 2.29 L/h, giving the rounded values of 1.8 and 2.9 L/h. The lower boundary for non-outlier values was approximated to be 4.3 times less than the mean and the upper boundary 1.8 times the mean, which leads us to the rounded values of 0.53 and 4.1 L/h. This last series of simulations was done based on the fact that the intestinal and hepatic CYP3A content are not correlated within individuals [60]. Therefore, the values of $CL_{int,G}$ and $CL_{int,H}$ do not need to be paired.

5.4.4 *Noncompartmental analysis*

The concentrations vs time profiles of cyclosporine generated by the simulations were analyzed by noncompartmental methods. The AUC from time 0 to the last measurable concentration (AUC_t) was calculated by the linear trapezoidal method. The apparent first-order terminal elimination rate constant (k_{el}) was calculated by linear least-squares regression analysis using at least 3 points in the log-linear terminal phase. The AUC from time 0 to infinity (AUC_{inf}) was calculated as the sum of AUC_t plus the ratio of the last measurable blood concentration to k_{el} . The apparent first-order terminal elimination half life ($t_{1/2}$) was calculated as $0.693/k_{el}$. The maximum blood cyclosporine concentration (C_{max}) and its corresponding time (t_{max}) were obtained for each individual by directly observing their blood cyclosporine concentration vs. time profile. The systemic clearance (CL_s) was calculated as the ratio of $Dose_{IV}/AUC_{inf}$.

Bioavailability determination

In order to calculate the bioavailabilities resulting from the different simulations, all sets of parameter values were used to simulate both an oral dose of 200 mg and an IV infusion of 175

mg over 2.5h. The bioavailability following oral administration (F) was calculated as $(Dose_{iv} \cdot AUC_{inf_{PO}}) / (Dose_{PO} \cdot AUC_{inf_{iv}})$.

5.5 Results

5.5.1 Allometric scaling

Predictions of CL_S and V_{ss} in humans are presented in Table 3. Results differ greatly between extrapolation methods. Based on the 'rule of exponent' method described in the methodology, with an exponent of 1.165, brain weight correction (equation 3) should be used. This method under predicts CL_S of cyclosporine by at least 72% and the V_{ss} by at least 58%, which is an improvement from simple allometry. This latter overestimated the CL by 100% and the V_{ss} by at least 395%. The allometric method giving the most accurate results compared to the observed values is the one with the maximum life span potential corrections (equation 2).

5.5.2 PBPK modeling

5.5.2.1 Addition of an extrahepatic metabolism term for IV administration

Figure 4 presents the concentrations vs time profiles of cyclosporine following a dose of 4 mg/kg given as an IV infusion over 2.5h obtained with and without gut metabolism. These simulations are done with the PBPK model originally developed by Rowland and al. for intravenous administration and described above in the methodology section. The simulations done from the model were well reproduced for the rat (data not shown) but failed to be reproducible in humans after scale-up. It can be noted that the decrease in simulated concentrations is not as steep as it should be according to what was reported in the original article [2]. The addition of extrahepatic metabolism does not change the C_{max} of the profiles but makes the concentrations go slightly lower after the end of infusion, which is an improvement. Table 4 compares the noncompartmental parameters of those simulations with observed values taken from the literature. Overall, the model does not completely describe the distribution phase of the blood concentration vs time profile of cyclosporine. This results in an overestimation of the AUC, which in turns leads to an underestimation of the CL_S and an

overestimation of V_{ss} . However, it can be seen from the PK parameters estimates that the addition of extrahepatic metabolism improves the prediction. The addition of an absorption module to the PBPK cyclosporine model then seemed appropriate and was further developed.

5.5.2.2 Caco-2 modeling

Results of the compartmental analysis of the Caco-2 cells experiments are shown in Table 5. All values are normalized per unit of surface area (cm^2).

5.5.2.3 Simulation with initial estimates

A first simulation for a 200 mg dose of cyclosporine to a 70 kg adult was performed using the full physiologically based absorption model with the initial estimates for all absorption parameters as described in the methodology section. The concentration vs time profile generated by this simulation is presented in Figure 6 and the resulting noncompartmental parameters are presented in Table 6. The results of the simulation are compared to data from a drug interaction study previously published by the authors [65]. A simulation for an IV infusion was also performed with the same model and parameter values (not shown) in order to calculate the resulting bioavailability for the oral administration. The initial values of the absorption parameters resulted in a bioavailability of 22.4%.

5.5.2.4 Sensitivity of the model to different parameter values

Results from the sensitivity analysis for the different absorption parameters are presented in Figure 7 to Figure 12. The sensitivity of the model to the combination of $CL_{int,H}$ and $CL_{int,G}$ is presented in Figure 7. Observed results were as expected and blood concentrations (as seen with AUCinf and Cmax) decreased with increasing clearance terms. Increasing CL_{int} (both in liver and gut) increases metabolism at first-pass, as seen with the decrease in F, and through systemic circulation, as seen with CL_s . The increase in CL_s becomes less steep with higher values of CL_{int} although not yet reaching a plateau. This tendency is less pronounced with the decrease in F. Over the 7-fold range of intrinsic clearances used, AUCinf decreased by 65%,

C_{max} by 58%, F by 54% and CL_s increased by 30%. Figure 8 presents the results for the sensitivity analysis to the CL_{int,G} term, while keeping CL_{int,H} fixed. In this case, the decrease in concentrations observed through the AUC_{inf} and C_{max} parameters is basically attributable to the increased first-pass in the gut. For a 7.7 fold increase in CL_{int,G}, F is decreased by 51% while the CL_s is increased by only 0.02%, which is negligible and well below experimental error.

Figure 9 illustrates the changes in the pharmacokinetics of cyclosporine with J_{max}. The efflux presents a net effect on the bioavailability of the drug and the concentrations decrease linearly with the increase in J_{max}. As for CL_{int,G}, J_{max} has very little effect on the CL_s but has a net effect on the first-pass in the gut, as seen with F.

The most surprising results are certainly the ones shown in Figure 10. The relation between the noncompartmental PK parameters and f_{ent}, is not straightforward. The fraction of gut blood flow going to the enterocytes layer varied between 0.25% and 15%. Like for other parameters related to the absorption process from the gut, the effect on the systemic clearance is minimal and reaches a plateau at a f_{ent} value of approximately 5%. The bioavailability however shows a completely different behavior than what can be seen with the variation of other absorption parameters. This behavior is directly reflected in the changes in AUC_{inf} and C_{max}. Increasing f_{ent} from 0.25% up to 2.5% increases F from 17.4% to 22.4% and AUC_{inf} is increased by 27%. However, further increases in f_{ent} have the opposite effect and the bioavailability decreases. At a f_{ent} value of 15%, the AUC_{inf} is as low as with a f_{ent} value of 0.25%. In order to help the interpretation of the first set, a second set of simulations was also performed with a fixed enterocytes volume (2.5% of the gut) but with varying blood flow fraction (f_{ent} from 0.25% to 15%). Results of this set of simulations are not shown as they were essentially the same whether the enterocytes volume was kept constant or not.

The effective absorption surface is the parameter that demonstrates the most critical and direct effect on the resulting cyclosporine blood concentrations, as seen in Figure 11. The bioavailability of cyclosporine is almost directly proportional to S_{abs}. For a 5.2 fold increase in S_{abs}, F and AUC_{inf} increase by 4.2 fold and C_{max} by 4.1 fold. As for other absorption

parameters, the effect on CL_s is negligible with an increase of less than 1% for the value range studied.

Finally, the last parameter that was looked at is the small intestinal transit time. Again, effect on CL_s is negligible with an increase of less than 0.1% for Q_{tr} between 223 mL/h and 1807 mL/h. Although not as spectacular as the effect seen with S_{abs} , the transit rate through the small intestine has a net effect on the blood concentrations. Over the 8-fold increase in Q_{tr} studied, F increases from 9.5% to 28%, which represents a 3 fold increase in concentrations. Interestingly, it was possible to make a population simulation in relation with the variability in Q_{tr} . The concentration vs time profile generated by this simulation is presented in Figure 13 and the corresponding noncompartmental PK parameters are presented in Table 7.

5.6 Discussion

Prediction of CL_s obtained from simple allometric scaling is similar to previously published results [66]. According to the rule of exponent, we should consider brain weight as a correction factor. Correction for MLP gives the most accurate prediction in the case of cyclosporine. One question that can be raised is whether or not correction for MLP would be appropriate for other compounds metabolized in the liver. The initial rationale for using the MLP correction factor was based on the concept of neoteny, i.e. that biochemical processes in mammals could be related to their life expectancy. However, further work have revealed that this is not the case and that the exponent from simple allometry was generally the best determinant for selecting an allometric method [9, 66, 67]. In fact, even for drug eliminated by the kidneys, the rule of exponent might probably be applied but not for renally secreted drugs [9]. In terms of the well stirred model for liver metabolism, highly extracted drugs will tend to have a systemic clearance close to the liver blood flow. The prediction made by allometric scaling is then probably less sensitive to differences between species. However, cyclosporine has a hepatic extraction coefficient of approximately 0.2, which is relatively low, and differences between species will have a bigger impact on the prediction made for human.

Is *in vitro-in vivo* scaling better in this case for clearance prediction? A lot of studies have been published in order to evaluate the best methods to predict hepatic clearance from animal and *in vitro* data [13-16, 68-71]. An extensive comparison of allometric scaling approaches with *in vitro-in vivo* scaling has also been published [11]. The author concluded that in general, a physiologically-based *in vivo-in vitro* approach appears to give better results. Standard methods for extrapolating *in vivo* clearance from *in vitro* data usually underestimate the observed clearance. The topic has been and is still extensively explored. Some causes for bad predictions can be the presence of extrahepatic metabolism or the presence of active transport in hepatocytes. In terms of scaling factors between human microsomes or hepatocytes and human liver, values generally used are quite standard and are based on a single point estimates [14, 68, 69]. However, due to the known variability in CYP enzymes content between individuals, ideally, scaling factors should be based on the content of individual enzymes. The approach proposed by Shiran [59] integrates *in vitro* data from recombinant CYPs with CYP abundance and variations in genetic activity and abundance is quite interesting. Although it does not solve other pitfalls of *in vitro* methods, it has the net advantage of giving a variability term in the whole process. Among the predicted clearance values available in the literature for cyclosporine, it is in fact this *in vitro-in vivo* approach that gave the best prediction and it was this value that was used in the simulations [59].

In general, allometric predictions are better for V_c than for V_{ss} [9]. However, V_{ss} is usually more convenient to determine. As mentioned in the methodology section, the rule of exponent does not apply to V_{ss} and simple allometry should be used. For the case of cyclosporine however, simple allometry overestimates the experimental volume by at least 395% whereas the prediction made with correction for MLP falls within the range of observed values. Molecular descriptors and unbound fraction have also been used as correction factors in allometric predictions of V_{ss} but no real improvement has been demonstrated yet [17]. When using a more elaborated model like the one proposed by Kawai [2], with and without a gut metabolism term, V_{ss} predicted values are 62-83% higher than the observed values. Adding gut metabolism to the model through a gut absorption model does not make much improvement on the prediction of

V_{ss} 136 L (not shown in tables) vs 140 L without any gut metabolism. Anyhow, the physiologically based approach falls within the 2-fold prediction errors usually considered as acceptable, which is not the case for allometry. Although the MLP correction gives the best prediction for cyclosporine, it would need further investigation to see if the approach can be generalized, considering the lack of physiological ground to use this type of correction factor for the prediction of the volume of distribution.

Another interesting approach to predict the volume of distribution is the one proposed by Poulin and Theil [6]. Although this method is generally equivalent to allometry in terms of performance [17], it has the net advantage that there is no need for animal experiments and that it is the fastest method to use. Their method is based on theoretical tissue:plasma partition coefficient determined from the tissue composition, i.e. volume of water, neutral lipids, phospholipids and interstitial space. The organs considered in their model cover approximately 80% of total body weight. The predicted V_{ss} for cyclosporine with this method is 194 L for a 70 kg individual, which is 53-150% above the observed volume (reported in Table 3) and within a 2-3 fold prediction error, but is still much better than simple allometry. Considering that the development of a full PBPK model is time consuming, the approach proposed by Poulin and Theil could be considered a valid approach for the V_{ss} prediction of cyclosporine.

With the proposed absorption model and the original parameter values, the oral bioavailability is 22.4%. In healthy volunteers, the bioavailability of the Neoral® formulation was reported to be 33-39% for a 5 mg/kg oral dose (350 mg for a 70 kg adult) [37]. An average bioavailability of 22.1% was reported following a 7.5 mg/kg oral dose of the Sandimmune soft gelatin capsules in healthy volunteers [7]. The predicted bioavailability is therefore within a 2-fold error prediction and can be considered as a good prediction. Allometric scaling is usually not used for the prediction of bioavailability as it can hardly be related to body weight and predictions are usually bad [9]. The fraction absorbed (F_A) is usually determined from *in vitro* and *in silico* methods. The reader is referred to a recently published review by Fagerholm on gastrointestinal absorption prediction methods for a thorough overview [20]. Among the available methods, Caco-2 cells permeability experiments appear to be helpful in studying active

transport but often fail to predict F_A [20]. The compartmental analysis of a Caco-2 cell transport experiment that is proposed in this paper is, to the best of our knowledge, a novel way to use information from Caco-2 cells in order to integrate it with PBPK modeling. The absorption model proposed here shares common features with the model implemented in the commercially available software GastroPlusTM but in terms of active transport in the gut wall, no J_{max} and K_m are estimated prior to the simulation and these values are fitted to real data [22]. The approach proposed here with compartmental analysis of a standard transport experiment has the advantage of being simple and providing both passive and active transport parameters for the apical and basolateral sides of enterocytes.

A number of assumptions had to be made to build the absorption model for cyclosporine and it is important to have an idea of their potential impact on the predicted cyclosporine concentrations following oral administration. As expected and as seen from Figure 7 and Figure 8, the estimation of the metabolic clearance from the liver has an impact on both CL_s and first-pass effect. The estimation of the clearance from the gut appears to be of minor importance for CL_s but has a major impact on the bioavailability. The same can be said from the effect of J_{max} as seen in Figure 9. These results are consistent with the effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of cyclosporine. In healthy volunteers, the concomitant intake of grapefruit juice increases the average AUC by 55-60% and the average C_{max} by 35-43% [7, 72]. The inhibiting effect of grapefruit juice on CYP3A enzymes and P-gp transporters is limited to the gut and grapefruit has no detectable effect on the pharmacokinetics of cyclosporine following intravenous administration [7]. Grapefruit juice administration decreases CYP3A4 protein concentration in enterocytes by approximately 30% following the consumption of a single glass, probably by a mechanism-based inactivation, without decreasing the mRNA content [73-75]. With an initial $CL_{int,G}$ of 4.1 L/h, based on observed systemic clearance, we can approximate from the results shown in Figure 8 that for a decrease of 30% in $CL_{int,G}$, AUC_{inf} increases by 21% and C_{max} increases by 20%. Unlike for CYP3A4 enzymes, the protein inhibition of P-gp seems to be more of a competitive nature [75]. Unfortunately, there is no data available in the

literature that would allow estimating the inhibitory constant of grapefruit juice on the transport of cyclosporine.

For f_{ent} , the plateau seen with CL_s results from the fact that for low values of f_{ent} , the clearance is more capacity dependant whereas for higher values the clearance becomes blood flow dependant. Actually for cyclosporine, the terms $CL_{int,G}$ and $Q_G \cdot f_{ent}$ are equal for an f_{ent} value of 3.5%. It was expected that the bioavailability would then decrease with increasing f_{ent} so the initial increase in F is unexpected and unexplainable at the moment. Further investigations are needed regarding this parameter.

It can be seen from Figure 11 that the assessment of the surface of absorption is critical for the development of an absorption model. If we consider the small intestine simply a tube, the bioavailability of cyclosporine would be 8%. Doubling the surface of absorption directly doubles the bioavailability of cyclosporine. To put things into perspective, the error resulting from the estimation of the relative expression of P-gp in Caco-2 cells system vs the small intestine is probably less dramatic. Considering half the amount of P-gp and therefore half J_{max} , the bioavailability increases by a factor of only 1.1. As pointed out by Artursson et al. [56], drugs with low permeability can probably remain longer in the intestinal lumen and have more time to diffuse down the length of the villi whereas drugs with high permeability can be rapidly absorbed at the villi tips. If we were to consider a generic model for intestinal absorption, it is then probably not advisable to use a single estimate of the absorption surface for all types of drugs.

Sensitivity analyses are generally used to investigate about the importance of the different input parameters in the final output response. In addition, it can help to see if some parameters are correlated with one another and if some could be dropped from the model. Eventually the process can help in simplifying models. The aim of the sensitivity analysis performed in this particular study was to get a general idea of how the absorption model behaves, i.e. if it made sense or not to use it. The type of sensitivity realized was then quite basic, i.e. series of simulations were done with one parameter varying at a time (local sensitivity). The parameter values were selected within the estimated range of possible values based on current knowledge. The next step regarding the absorption model developed in this study but also the distribution

model previously developed by M. Rowland, would be to perform a more thorough sensitivity analysis. Nonetheless, the simple sensitivity analysis performed in this study for the cyclosporine absorption model, allows us to identify key parameters that should be looked at in future work. For example, the uncertainty in the small intestinal surface of absorption has a major impact on the bioavailability determination. Other more or less advanced techniques exist to perform sensitivity analysis [76]. One may use a systematic increase of 0.1% for their parameters [77] or proceed with partial derivative, which represents a lot of work when dealing with big sets of parameters but is very informative [78, 79]. In the PBPK field, the use of a complex method called FAST (Fourier amplitude sensitivity test) was also proposed to help reducing whole body PBPK models [80]. This later is a global sensitivity analysis in the sense that all parameters are varied simultaneously. Sensitivity analyses have been used extensively in other modeling fields for quite a while [76] but their use is not widely spread yet in the PBPK field. Since this type of modeling usually requires a fair amount of parameters, all having a certain degree of uncertainty, it will certainly gain from applying sensitivity analyses techniques in a more rigorous manner.

With regard to the population simulation, physiological models are theoretically an ideal tool to incorporate known variability on physiological parameters. In practice, although the mathematical knowledge and tools are present, not that many data are available yet on the statistical distribution and variability of physiological parameters used for this type of modeling. We have performed such a simulation as an example with the incorporation of the variability on the intestinal transit time.

5.7 Conclusion

The objective of this study was to evaluate if it is worth developing a PBPK model for the specific case of cyclosporine where a lot of data is available from the literature vs allometric scaling. For cyclosporine, the best prediction for CL_s and V_{ss} was achieved with allometric scaling using MLP as a correction factor. However, there is no *a priori* rationale to use this correction factor and it cannot be generalized to other drugs substrate of CYP3A and P-gp. In a

more general context, the brain weight would have been used as a correction factor but this method is not better than more physiological approaches. For equal performance between allometry and PBPK modeling, PBPK has the advantage of requiring no or very few animals but the disadvantage of requiring a lot of data input. The complexity of the model (generic or specific) will however depend on the questions to be answered, i.e. is a rough estimate of the pharmacokinetics in human sufficient or does the PK profile need to be precisely described. When it comes to drug bioavailability, a more mechanistic approach is certainly a more promising avenue. We have presented an absorption model for oral administration that integrates both drug metabolism and transport in the gut wall and from which we directly obtain a value for F . The transport parameterization uses a compartmental analysis of standard Caco-2 cells permeability experiments.

Physiological approaches are not optimal right now. However, they have the advantage of having the possibility to evolve as we gain more knowledge on physiology and on the expression and distribution of drug metabolizing enzymes and transporters, not only in the gut but in other tissues. Other avenues like transport processes in hepatocytes will have to be looked at as they can certainly modulate the drug concentration in hepatocytes relative to blood concentrations. Some physiological parameters like the effective surface of absorption and the volume of the enterocytes layer and its blood perfusion relative to the whole intestinal tissue would also need further exploration.

5.8 References

1. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: reevaluation of dose-nonlinear kinetics in rats. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; 27(6):597-623
2. Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287(2):457-68
3. Tanaka C, Kawai R, Rowland M. Dose-dependent pharmacokinetics of cyclosporin A in rats: events in tissues. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(5):582-9
4. Bernareggi A, Rowland M. Physiologic modeling of cyclosporin kinetics in rat and man. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991; 19(1):21-50
5. Poulin P, Theil FP. A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J Pharm Sci* 2000; 89(1):16-35
6. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci* 2002; 91(1):129-56
7. Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57(5):485-91
8. Boxenbaum H. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1982; 10(2):201-27
9. Mahmood I: Interspecies Pharmacokinetic Scaling: principles and application of allometric scaling. Rockville, Maryland: Pine House Publishers; 2005
10. Tang H, Mayersohn M. A global examination of allometric scaling for predicting human drug clearance and the prediction of large vertical allometry. *J Pharm Sci* 2006; 95(8):1783-99

11. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--evaluation of methods for prediction of hepatic metabolic clearance. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(6):803-28
12. De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Gilissen RA, Mackie CE, Nijssen MJ. The prediction of drug metabolism, tissue distribution, and bioavailability of 50 structurally diverse compounds in rat using mechanism-based absorption, distribution, and metabolism prediction tools. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(4):649-59
13. Ito K, Houston JB. Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches. *Pharm Res* 2005; 22(1):103-12
14. Riley RJ, McGinnity DF, Austin RP. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(9):1304-11
15. Ito K, Houston JB. Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm Res* 2004; 21(5):785-92
16. Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab Dispos* 2001; 29(10):1316-24
17. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics - evaluation of methods for prediction of volume of distribution. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(9):1181-90
18. Poulin P, Schoenlein K, Theil FP. Prediction of adipose tissue: plasma partition coefficients for structurally unrelated drugs. *J Pharm Sci* 2001; 90(4):436-47
19. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci* 2005; 94(6):1259-76
20. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--gastrointestinal absorption. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(7):905-16

21. Cai H et al. Evaluation of an integrated in vitro-in silico PBPK (physiologically based pharmacokinetic) model to provide estimates of human bioavailability. *Int J Pharm* 2006; 308(1-2):133-9
22. Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50 Suppl 1:S41-67
23. Brightman FA, Leahy DE, Searle GE, Thomas S. Application of a generic physiologically based pharmacokinetic model to the estimation of xenobiotic levels in human plasma. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):94-101
24. Brightman FA, Leahy DE, Searle GE, Thomas S. Application of a generic physiologically based pharmacokinetic model to the estimation of xenobiotic levels in rat plasma. *Drug Metab Dispos* 2006; 34(1):84-93
25. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci* 2002; 91(5):1358-70
26. Theil FP, Guentert TW, Haddad S, Poulin P. Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection. *Toxicol Lett* 2003; 138(1-2):29-49
27. Jones HM, Parrott N, Jorga K, Lave T. A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(5):511-42
28. AHFS Drug Information, édité par McEvoy GK, Bethesda, MD, 2007, <http://online.statref.com>
29. Legg B, Rowland M. Cyclosporin: erythrocyte binding and an examination of its use to estimate unbound concentration. *Ther Drug Monit* 1988; 10(1):16-9
30. Kawai R, Lemaire M, Steimer JL, Bruehlisauer A, Niederberger W, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetic study on a cyclosporin derivative, SDZ IMM 125. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994; 22(5):327-65

31. Jin M et al. Contributions of intestinal P-glycoprotein and CYP3A to oral bioavailability of cyclosporin A in mice treated with or without dexamethasone. *Int J Pharm* 2006; 309(1-2):81-6
32. Lee YJ, Chung SJ, Shim CK. Limited role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of cyclosporin A. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(4):760-3
33. Sangalli L, Bortolotti A, Jiritano L, Bonati M. Cyclosporine pharmacokinetics in rats and interspecies comparison in dogs, rabbits, rats, and humans. *Drug Metab Dispos* 1988; 16(5):749-53
34. Kim SJ, Choi HK, Suh SP, Lee YB. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of cyclosporin A O/W-emulsion and microsphere formulations in rabbits. *Eur J Pharm Sci* 2002; 15(5):497-502
35. Gupta SK, Manfro RC, Tomlanovich SJ, Gambertoglio JG, Garovoy MR, Benet LZ. Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol* 1990; 30(7):643-53
36. Karamperis N, Povlsen JV, Hojskov C, Poulsen JH, Pedersen AR, Jorgensen KA. Comparison of the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine at equivalent molecular doses. *Transplant Proc* 2003; 35(4):1314-8
37. Min DI, Lee M, Ku YM, Flanigan M. Gender-dependent racial difference in disposition of cyclosporine among healthy African American and white volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(5):478-86
38. Wu CY et al. Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: studies with cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58(5):492-7
39. Avramoff A, Laor A, Kitzes-Cohen R, Farin D, Domb AJ. Comparative in vivo bioequivalence and in vitro dissolution of two cyclosporin A soft gelatin capsule formulations. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45(2):126-32
40. Galia E, Nicolaides E, Horter D, Lobenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res* 1998; 15(5):698-705

41. Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992; 90(5):1871-8
42. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(21):7735-8
43. Lown KS et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(3):248-60
44. Cong D, Doherty M, Pang KS. A new physiologically based, segregated-flow model to explain route-dependent intestinal metabolism. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(2):224-35
45. Pang KS: Physiological modeling of the small intestine in drug absorption dans *Advanced Methods of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Systems Analysis*, édité par D'Argenio DZ: Kluwer Academic Publishers, 2004:3-32
46. Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br J Pharmacol* 1996; 118(7):1841-7
47. Gres MC et al. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res* 1998; 15(5):726-33
48. Englund G et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2006; 29(3-4):269-77
49. Stephens RH, O'Neill CA, Warhurst A, Carlson GL, Rowland M, Warhurst G. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296(2):584-91
50. Taipalensuu J et al. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299(1):164-70

51. Mouly S, Paine MF. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res* 2003; 20(10):1595-9
52. Lennernas H, Ahrenstedt O, Hallgren R, Knutson L, Ryde M, Paalzow LK. Regional jejunal perfusion, a new in vivo approach to study oral drug absorption in man. *Pharm Res* 1992; 9(10):1243-51
53. Marieb EN, Laurendeau G: *Anatomie et physiologie humaines*. Saint-Laurent: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.; 1993
54. Yu LX, Crison JR, Amidon GL. Compartmental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int J Pharm* 1996; 140:111-8
55. Deferme S, Tack J, Lammert F, Augustijns P. P-glycoprotein attenuating effect of human intestinal fluid. *Pharm Res* 2003; 20(6):900-3
56. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46(1-3):27-43
57. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm* 1996; 127:103-7
58. Dudewicz EJ, Mishra SN: *Modern Mathematical Statistics*. New York: John Wiley & Sons; 1988
59. Shiran MR, Proctor NJ, Howgate EM, Rowland-Yeo K, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Prediction of metabolic drug clearance in humans: in vitro-in vivo extrapolation vs allometric scaling. *Xenobiotica* 2006; 36(7):567-80
60. von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivisto KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75(3):172-83
61. Paine MF et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283(3):1552-62

62. Yang J, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Cytochrome P450 3A expression and activity in the human small intestine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76(4):391
63. Lin YS et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002; 62(1):162-72
64. Paine MF, Ludington SS, Chen ML, Stewart PW, Huang SM, Watkins PB. Do men and women differ in proximal small intestinal CYP3A or P-glycoprotein expression? *Drug Metab Dispos* 2005; 33(3):426-33
65. Grenier J, Fradette C, Morelli G, Merritt GJ, Vrandeć M, Ducharme MP. Pomelo juice, but not cranberry juice, affects the pharmacokinetics of cyclosporine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79(3):255-62
66. Mahmood I, Balian JD. The pharmacokinetic principles behind scaling from preclinical results to phase I protocols. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(1):1-11
67. Mahmood I, Balian JD. Interspecies scaling: predicting pharmacokinetic parameters of antiepileptic drugs in humans from animals with special emphasis on clearance. *J Pharm Sci* 1996; 85(4):411-4
68. Iwatsubo T et al. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther* 1997; 73(2):147-71
69. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:461-99
70. Jones HM, Houston JB. Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(9):973-82
71. Yamamoto T, Itoga H, Kohno Y, Nagata K, Yamazoe Y. Prediction of oral clearance from in vitro metabolic data using recombinant CYPs: comparison among well-stirred, parallel-tube, distributed and dispersion models. *Xenobiotica* 2005; 35(6):627-46

72. Edwards DJ et al. 6',7'-Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65(3):237-44
73. Lown KS et al. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; 99(10):2545-53
74. Schmiedlin-Ren P et al. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents: decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos* 1997; 25(11):1228-33
75. Glaeser H et al. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(3):362-70
76. Hamby DM. A review of techniques for parameter sensitivity analysis of environmental models. *Environ Monit Assess* 1994; 32:135-54
77. Davda JP, Jain M, Batra SK, Gwilt PR, Robinson DH. A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model to characterize and predict the disposition of monoclonal antibody CC49 and its single chain Fv constructs. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(3):401-13
78. Evans MV, Dowd SM, Kenyon EM, Hughes MF, El-Masri HA. A physiologically based pharmacokinetic model for intravenous and ingested dimethylarsinic acid in mice. *Toxicol Sci* 2008; 104(2):250-60
79. Yokley KA, Evans MV. An example of model structure differences using sensitivity analyses in physiologically based pharmacokinetic models of trichloroethylene in humans. *Bull Math Biol* 2007; 69(8):2591-625
80. Gueorguieva I, Nestorov IA, Rowland M. Reducing whole body physiologically based pharmacokinetic models using global sensitivity analysis: diazepam case study. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2006; 33(1):1-27

81. Gomez DY, Wacher VJ, Tomlanovich SJ, Hebert MF, Benet LZ. The effects of ketoconazole on the intestinal metabolism and bioavailability of cyclosporine. Clin Pharmacol Ther 1995; 58(1):15-9

Species	BW (kg)	k	BSA	BrW (kg)	MLP x10⁵(h)
Mouse	0.025	0.059	0.005038	0.000417	0.26
Rat	0.25	0.09	0.0357	0.00174	0.39
Rabbit	2.75	0.093	0.182607	0.0115	0.76
Man	70	0.1	1.700906	1.53	8.18

Table 2 – Values used for allometric scaling for body weight (BW), shape factor (k), body surface area (BSA), brain weight (BrW) and maximum lifespan potential (MLP).

Equations	b (for CL _s)	b (for V _{ss})	CL _s (L/h) (%diff)*	V _{ss} (L) (%diff)*
1	1.165	1.205	50 (≥ 100)	623 (≥395)
2	1.429	1.413	12 (≤ -20)	100 (-)
3	1.913	1.876	4.2 (≤ -72)	32 (≤ -58)
4	1.542	1.552	35 (≥ 40)	342 (≥171)
Observed [7, 35, 37, 81]	-	-	15-25	77-126

*%difference from the mean observed values

Table 3 – Predicted systemic CL and V_{ss} of cyclosporine from allometric scaling for a 70 kg human adult. Equation 1 is for the simple allometry, 2 is for MLP correction, 3 is for BrW correction and 4 is for using BSA instead of BW.

	IV infusion 4 mg/kg over 2.5h			IV infusion 2.5 mg/kg over 3h		
	Simulation		Observed*	Simulation		Observed**
	$E_{\text{gut}}=0$	$E_{\text{gut}}=0.05$		$E_{\text{gut}}=0$	$E_{\text{gut}}=0.05$	
C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	3.20	3.07	-	1.84	1.75	2.6 ± 1.1
AUC _{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	43.0	31.7	11.4 ± 1.8	28.3	20.8	10.2 ± 2.3
Half-life (h)	15.1	12.0	-	15.9	12.7	6.1 ± 2.1
CL (L/h)	6.51	8.82	24.9 ± 4.2	6.18	8.42	19.0 ± 3.0
V _{ss} (L)	139	147	86 ± 15	140	150	82 ± 26

* From reference [35]

** From reference [7]

Table 4: Comparison of the simulated and observed pharmacokinetics of blood cyclosporine using the original model of Kawai and Rowland ($E_{\text{gut}}=0$) and the modified model with gut metabolism ($E_{\text{gut}}=0.05$).

Parameter	Fit value	Units
J_{\max}	283.8	pmol/min/cm ²
K_m	8326	pmol/mL
P_{ap}	0.0170	cm/min
P_{bas}	7.27×10^{-4}	cm/min

Table 5 - Active and passive transport parameter values obtained from compartmental analysis of Caco-2 cells permeability experiments.

	C _{max} (µg/mL)	AUC _{inf} (µg·h/mL)	T _{max} (h)	Half-life (h)
Simulation	0.490	7.62	2.3	11.7
Experimental* Mean (SD)	1.33 (0.23)	5.75 (0.98)	1.3 (0.3)	10.9 (1.9)
Difference from experimental mean	63%	33%	1.0h	0.8h

*From ref. [65]

Table 6: Comparison of the noncompartmental parameters for experimental and simulated data for a 200 mg oral dose of cyclosporine to a 70kg human adult using the absorption model with the initial estimates. Experimental values are from 12 healthy volunteers who received a 200 mg dose of cyclosporine with water.

	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	AUCinf ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	CL/F (L/h)	Tmax (h)	Half-life (h)
Mean	0.473	7.33	28.4	2.3	11.7
%CV	23.7	18.1	22.7	20.6	3.6
Median	0.467	7.35	27.2	2.5	11.6
Min	0.210	3.83	20.4	1.5	10.6
Max	0.712	9.80	52.2	3.0	12.5

Table 7: Descriptive statistics on the noncompartmental parameters from the population simulation of 50 individuals receiving a 200 mg oral dose of cyclosporine for a mean Q_{trs} of 1015 mL/h with a CV of 36%, assuming a normal distribution.

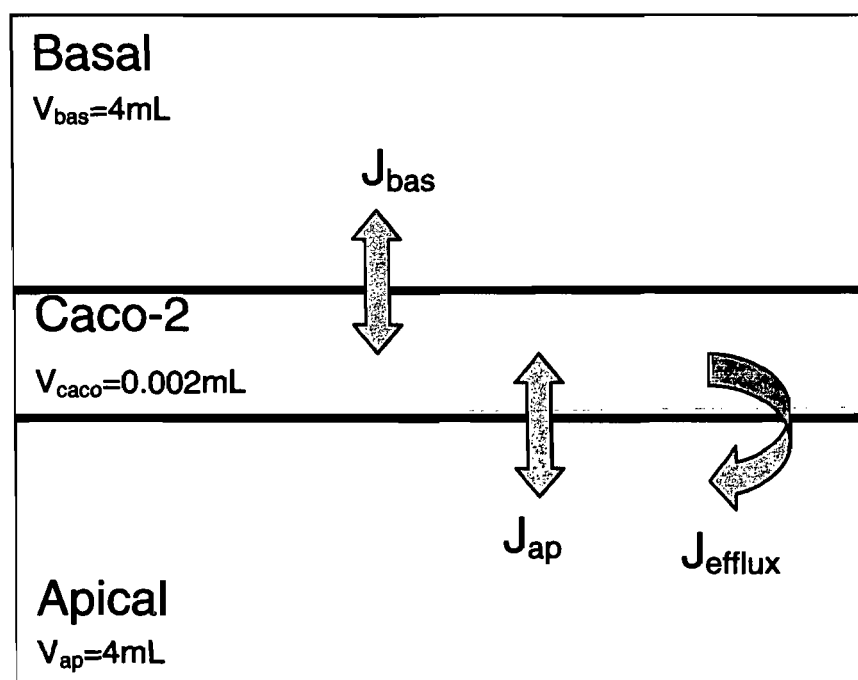


Figure 2: Compartment model for the active and passive transport of cyclosporine across Caco-2 cells. J_{efflux} represents the active transport from Caco-2 cells to the apical side; J_{bas} and J_{ap} are the flux associated to passive diffusion and for which the direction is determined by the concentration gradient.

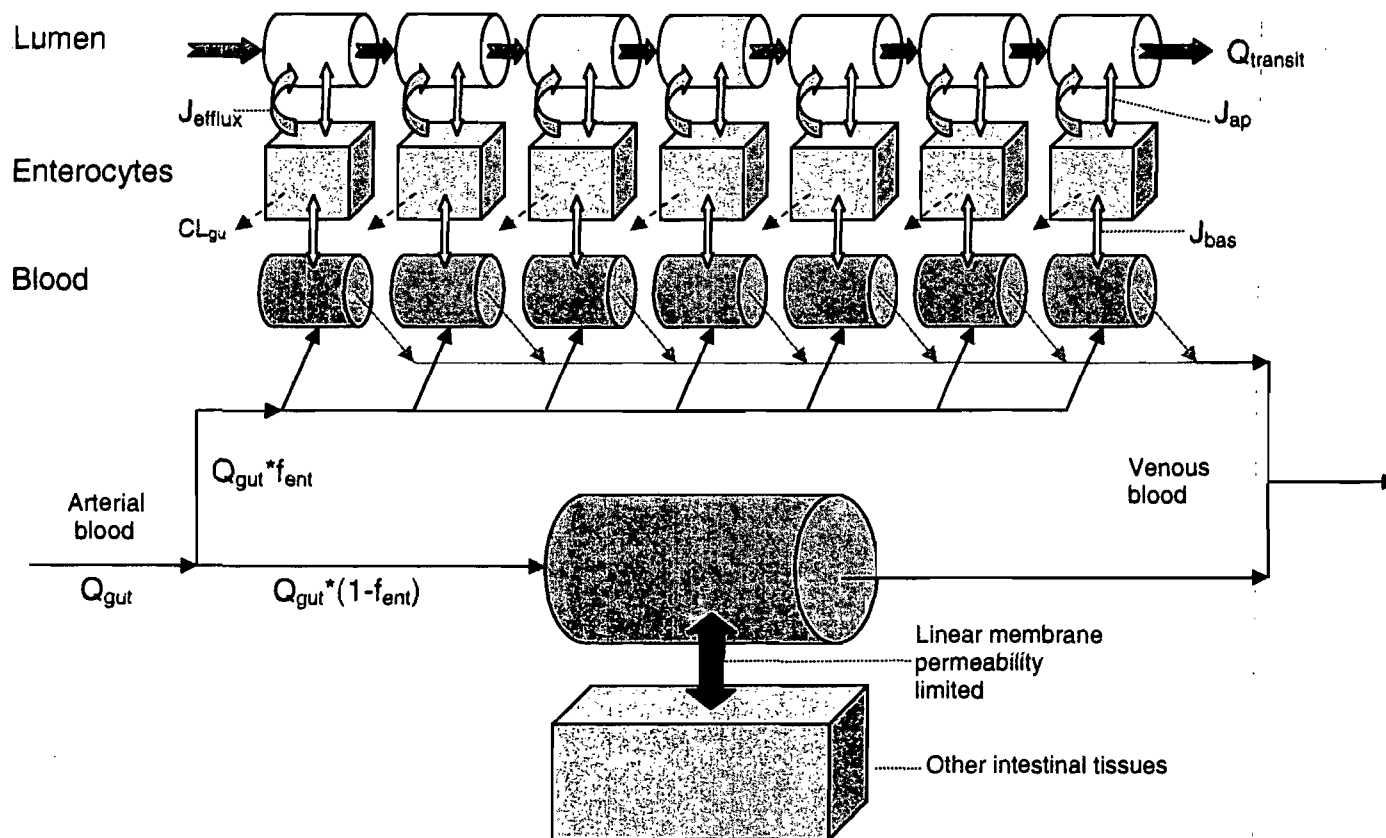


Figure 3 Schematic representation of the absorption from the gut lumen. J_{efflux} is the flux associated to active transport by P-gp; J_{ap} and J_{bas} are the flux associated to passive diffusion on the apical and basal side of the enterocytes, respectively; Q_{trans} is the small intestinal transit expressed as a flow; Q_{gut} is the blood flow perfusing the gut; f_{ent} is the fraction of Q_{gut} perfusing the enterocyte layer; CL_{gut} is the metabolic clearance in the enterocytes.

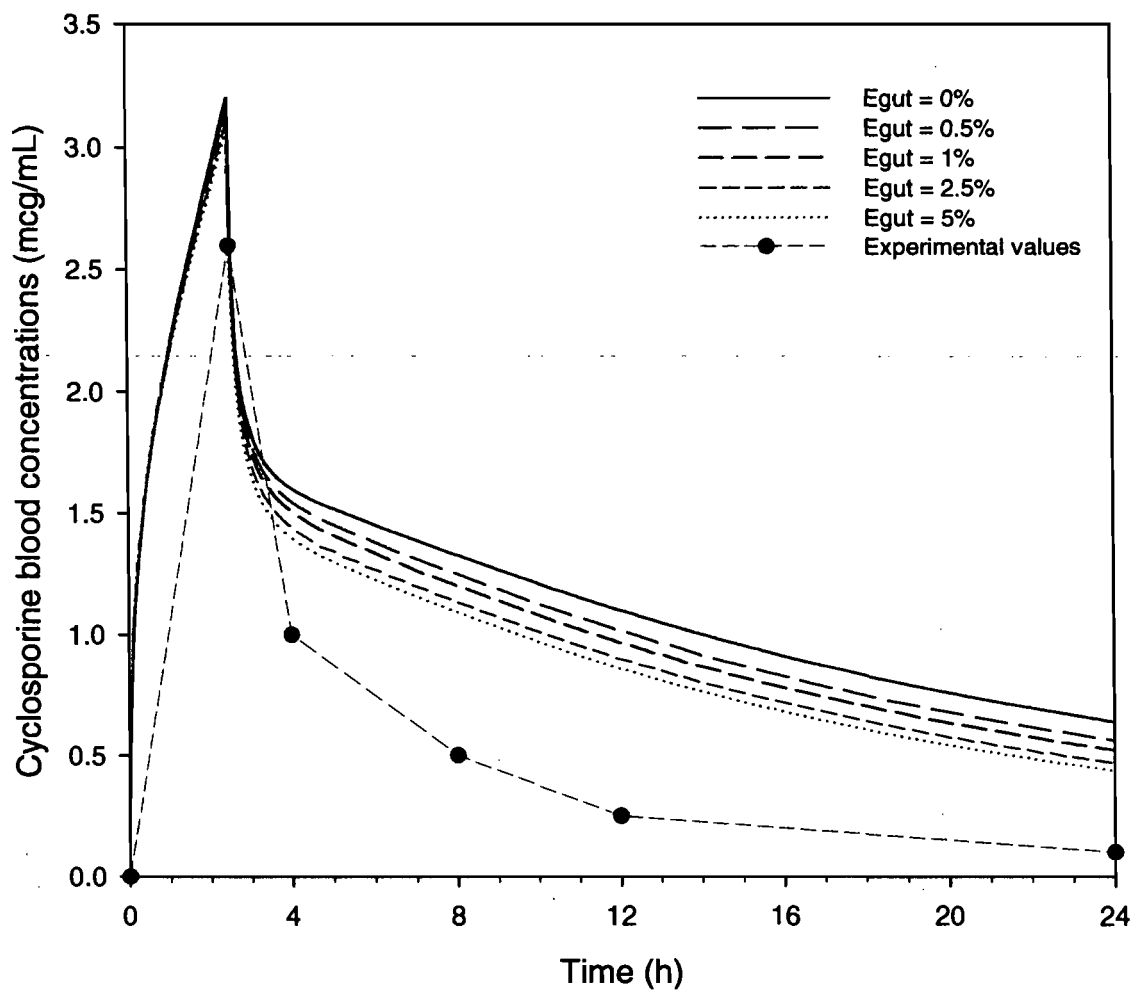


Figure 4: Simulation for a dose of 4 mg/kg given as an IV infusion over 2.5h to a 70kg adult with and without extrahepatic metabolism. The percentage for Egut represents the % of total observed clearance. The experimental values are approximations of data from the literature [35].

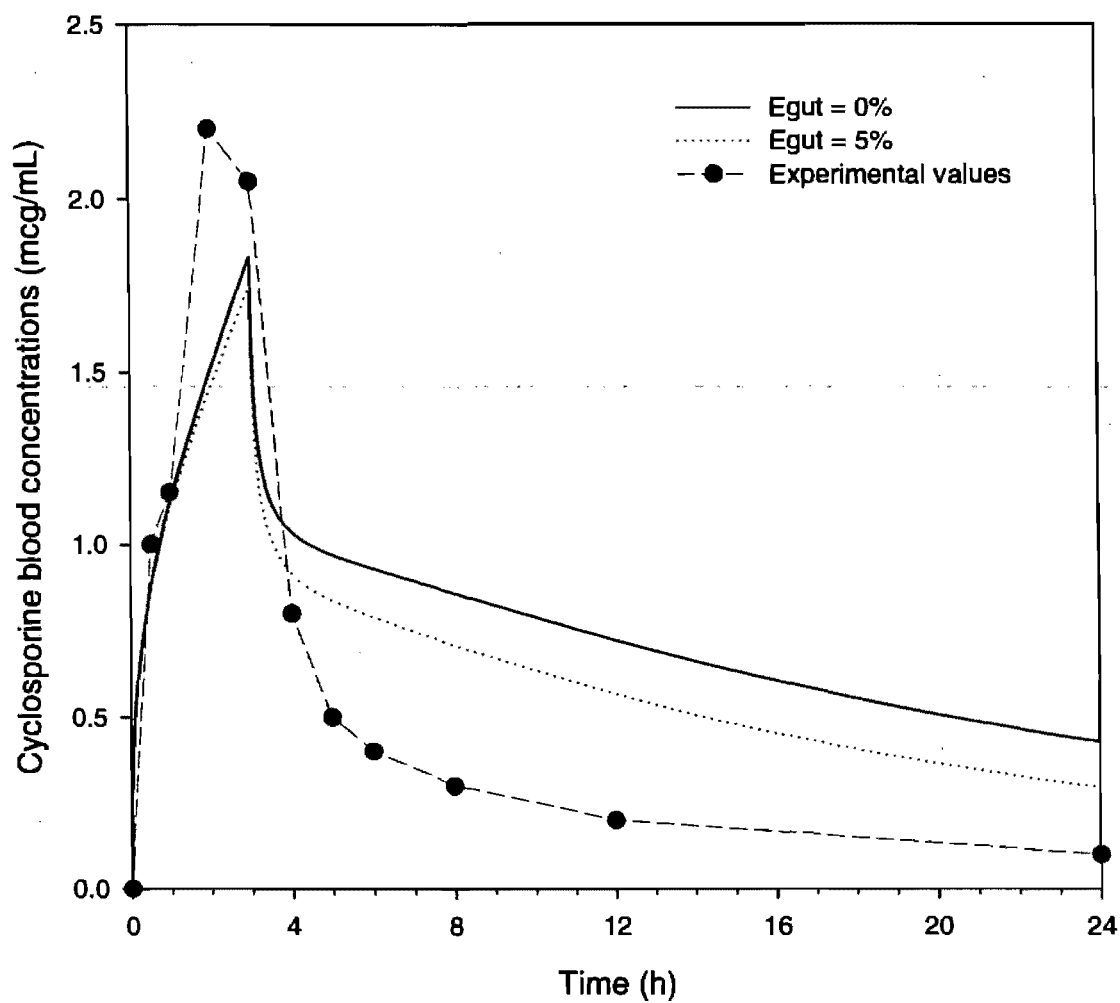


Figure 5: Simulation for a dose of 2.5 mg/kg given as an IV infusion over 3h to a 70kg adult with and without extrahepatic metabolism. The percentage for Egut represents the % of total observed clearance. The experimental values are approximations of data from the literature [7].

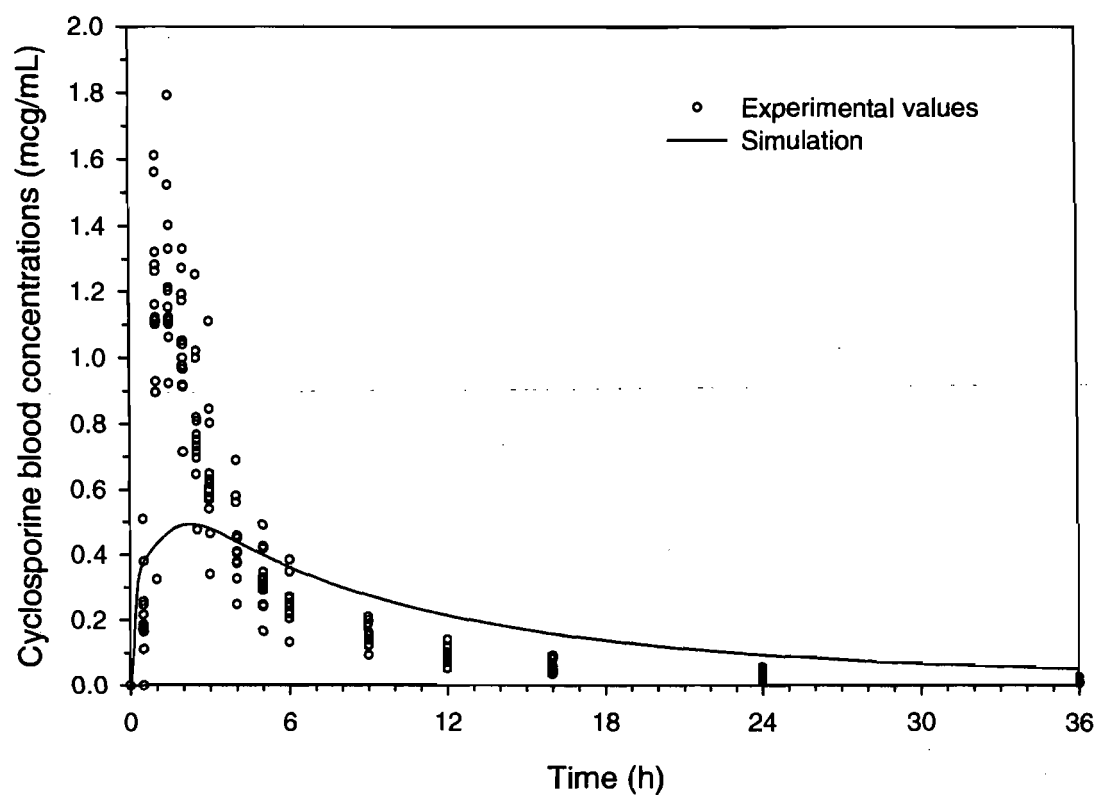


Figure 6: Simulation for a 200 mg oral dose of cyclosporine to a 70kg human adult using the absorption model with the initial estimates. Experimental values are from 12 healthy volunteers who received a 200 mg dose of cyclosporine with water (previously published [65]).

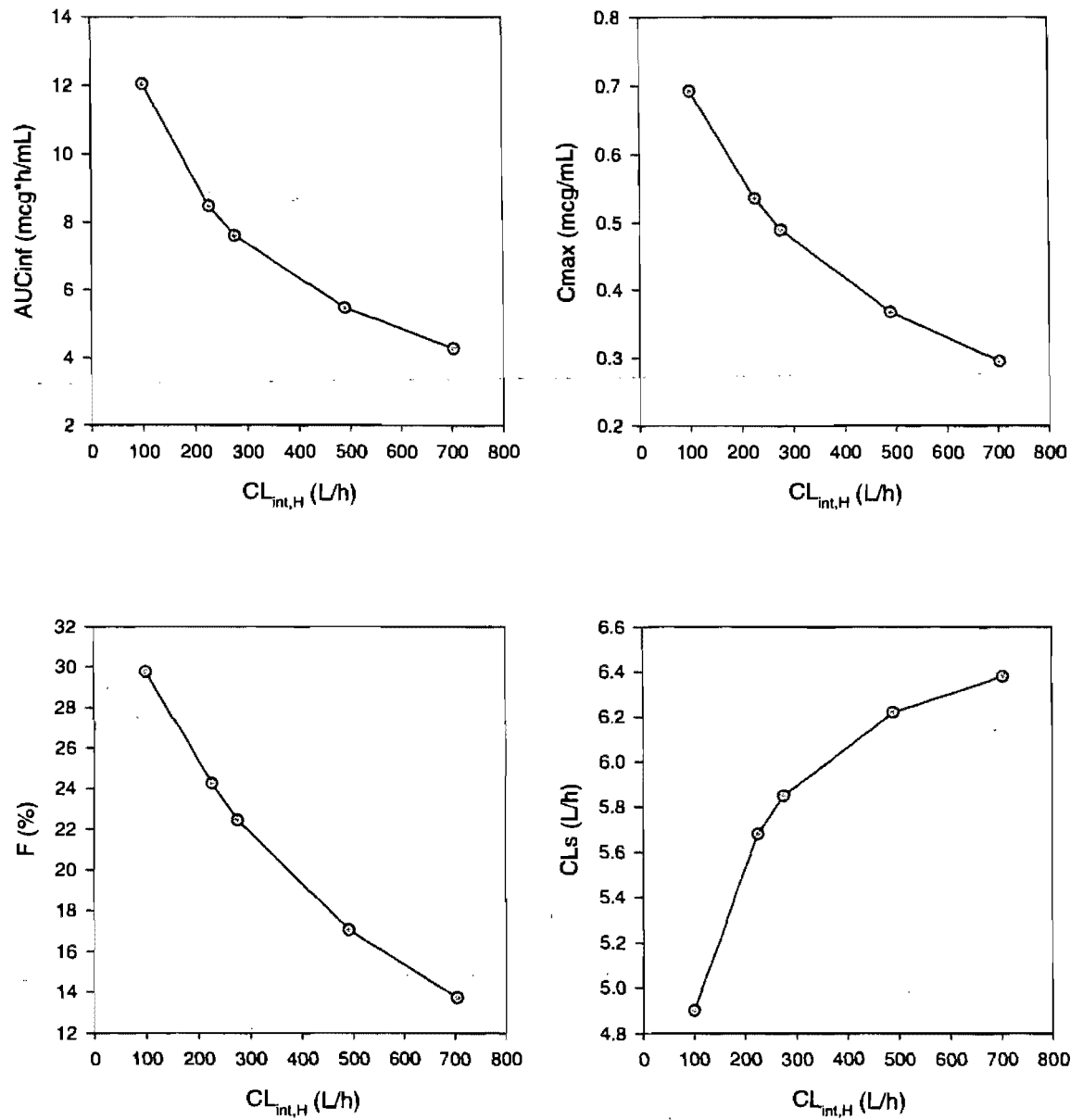


Figure 7: Effect of $CL_{int,H}$ and $CL_{int,G}$ on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose. The x axis represents the $CL_{int,H}$ values and the corresponding $CL_{int,G}$ is 0.83% of the $CL_{int,H}$, as described in the methodology section.

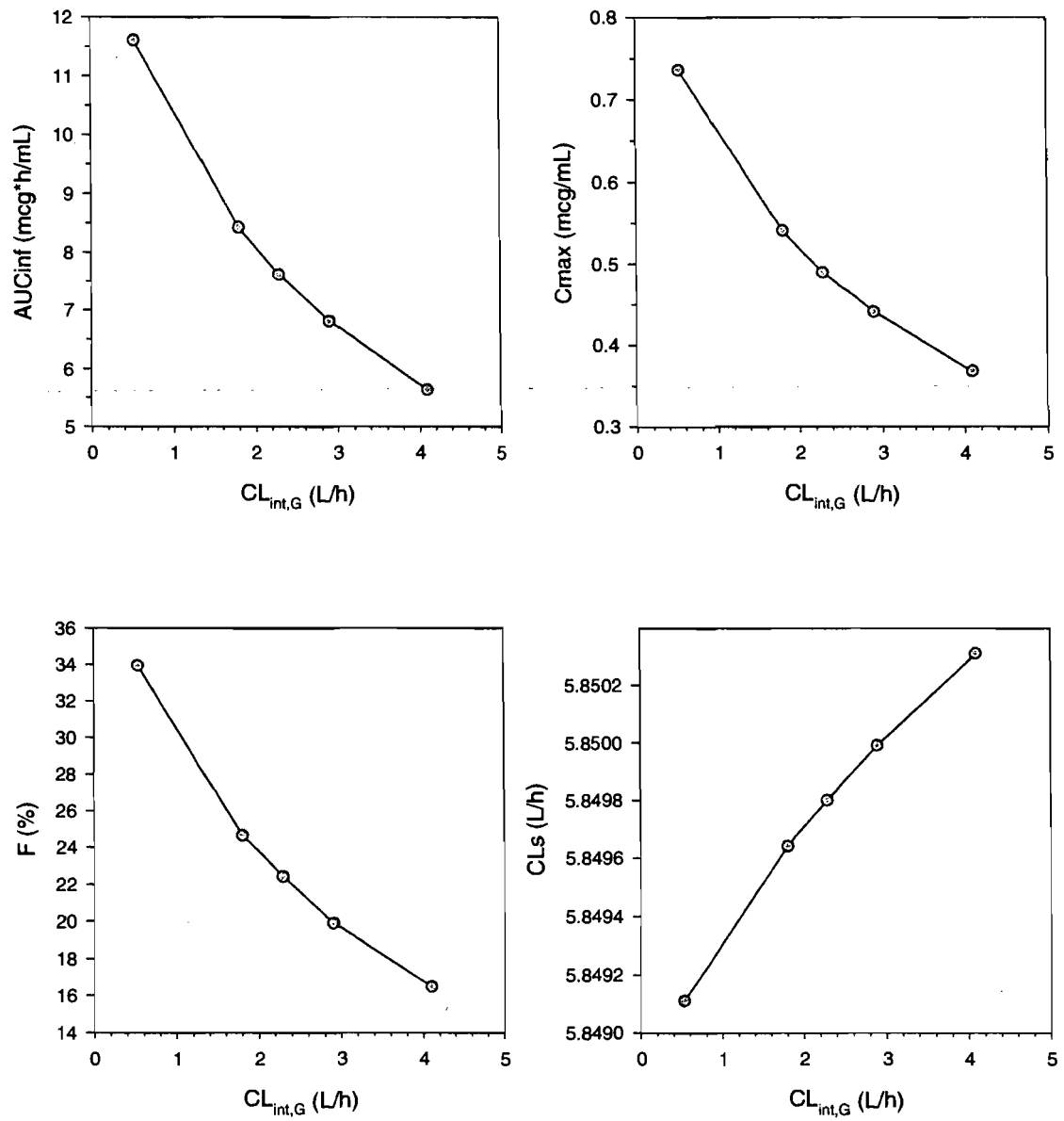


Figure 8: Effect of $CL_{int,G}$ on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose.

The $CL_{int,H}$ is fixed.

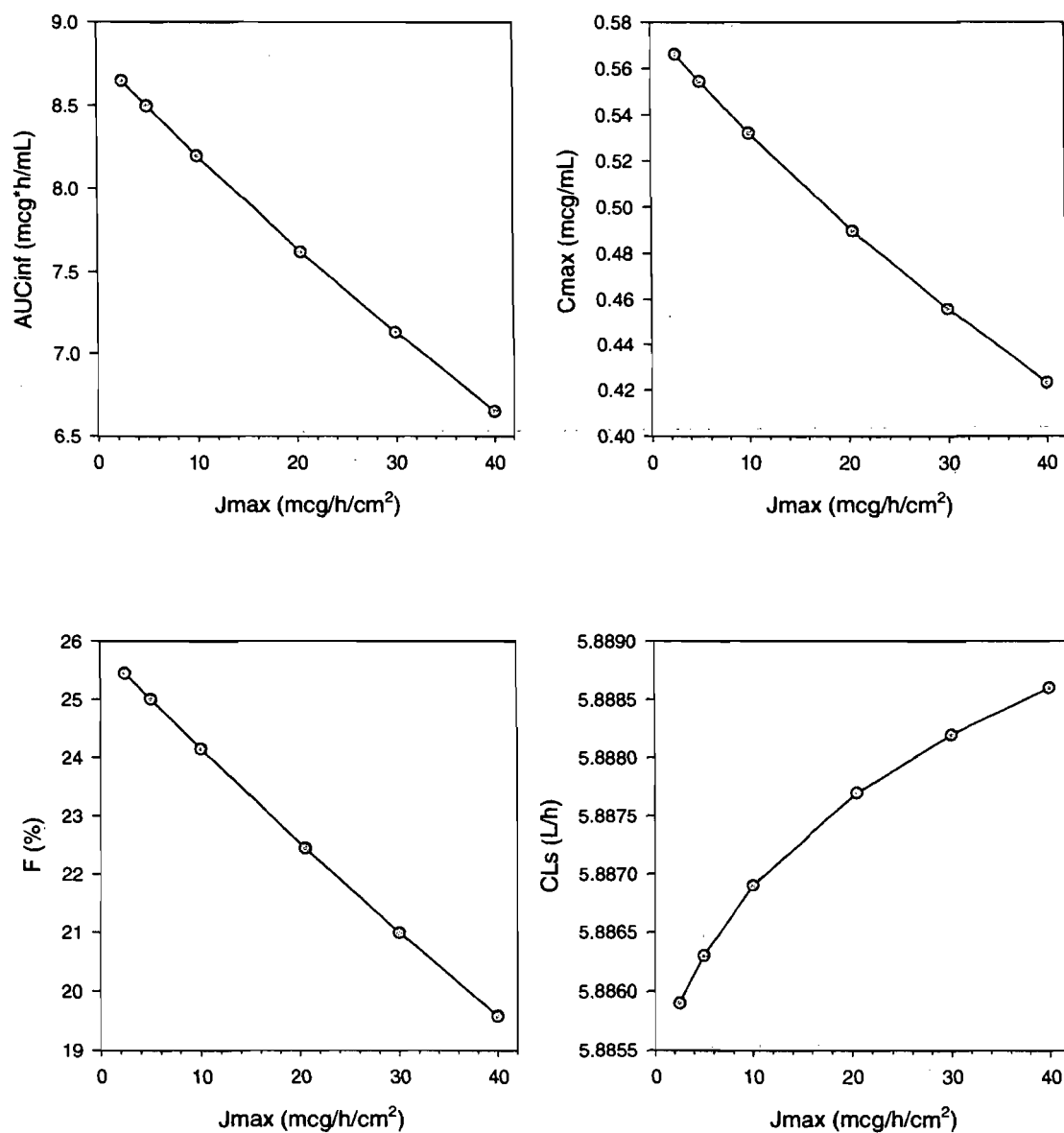


Figure 9: Effect of J_{\max} on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose.

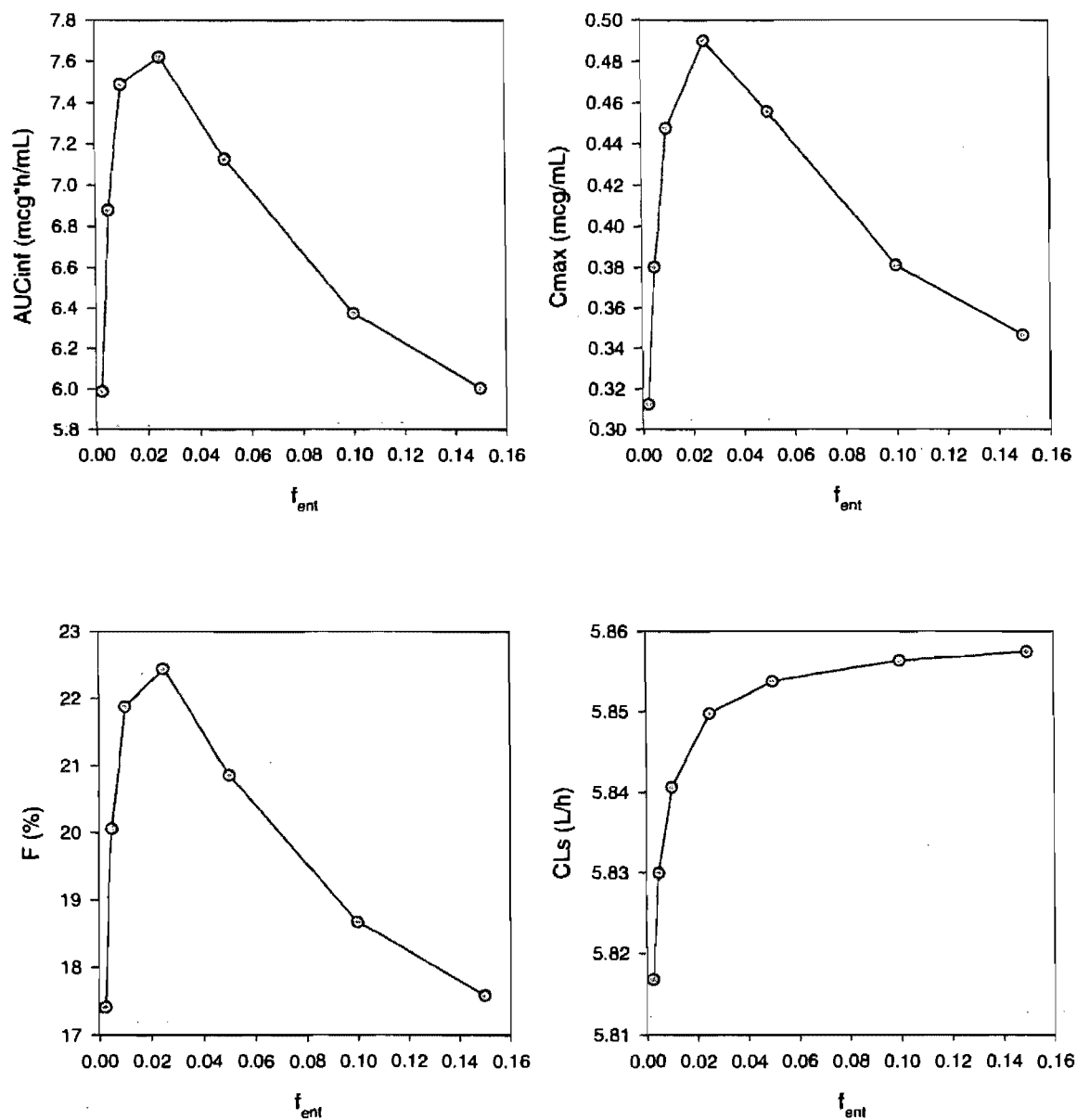


Figure 10: Effect of f_{ent} on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose

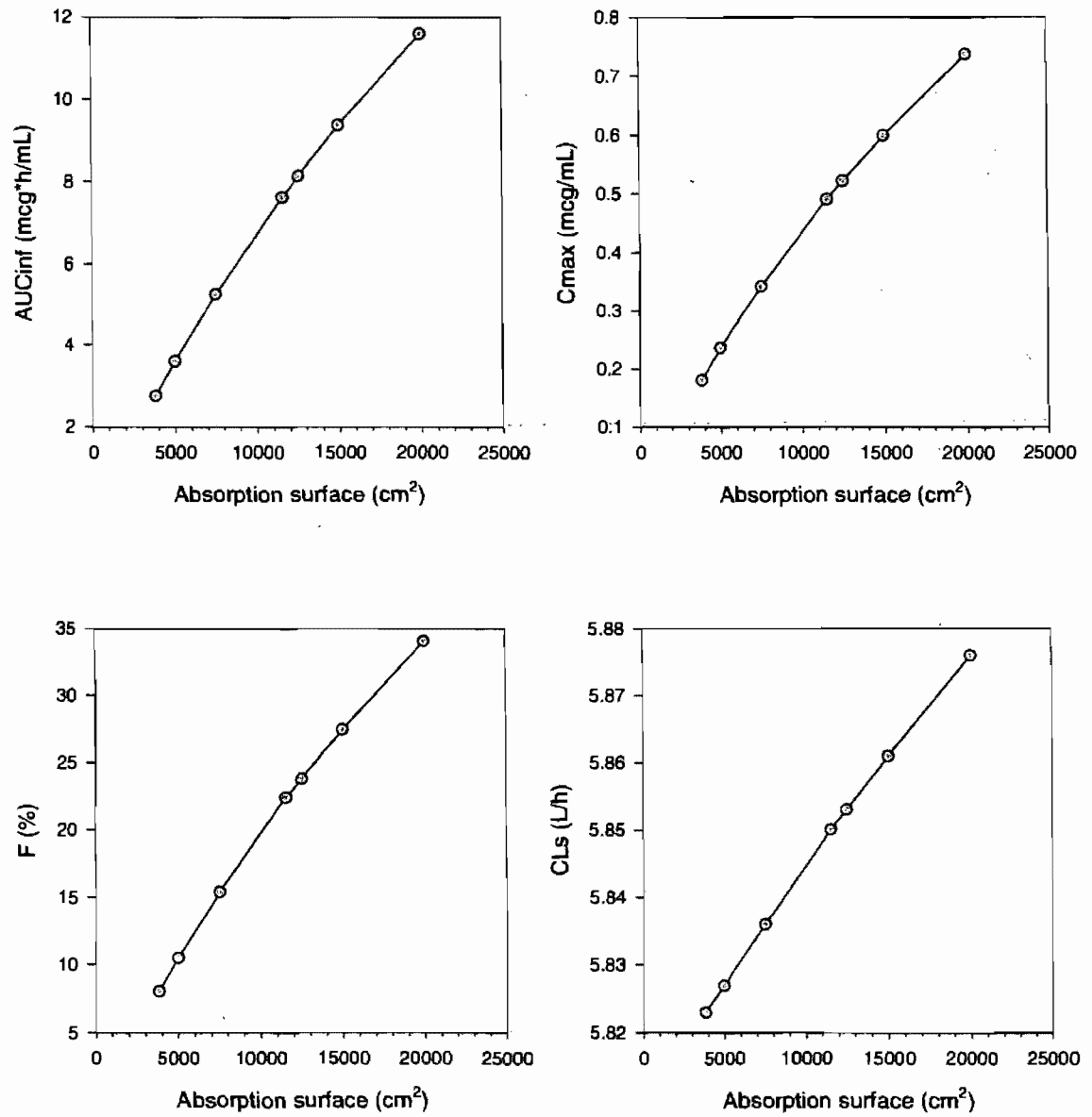


Figure 11: Effect of Sabs on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose

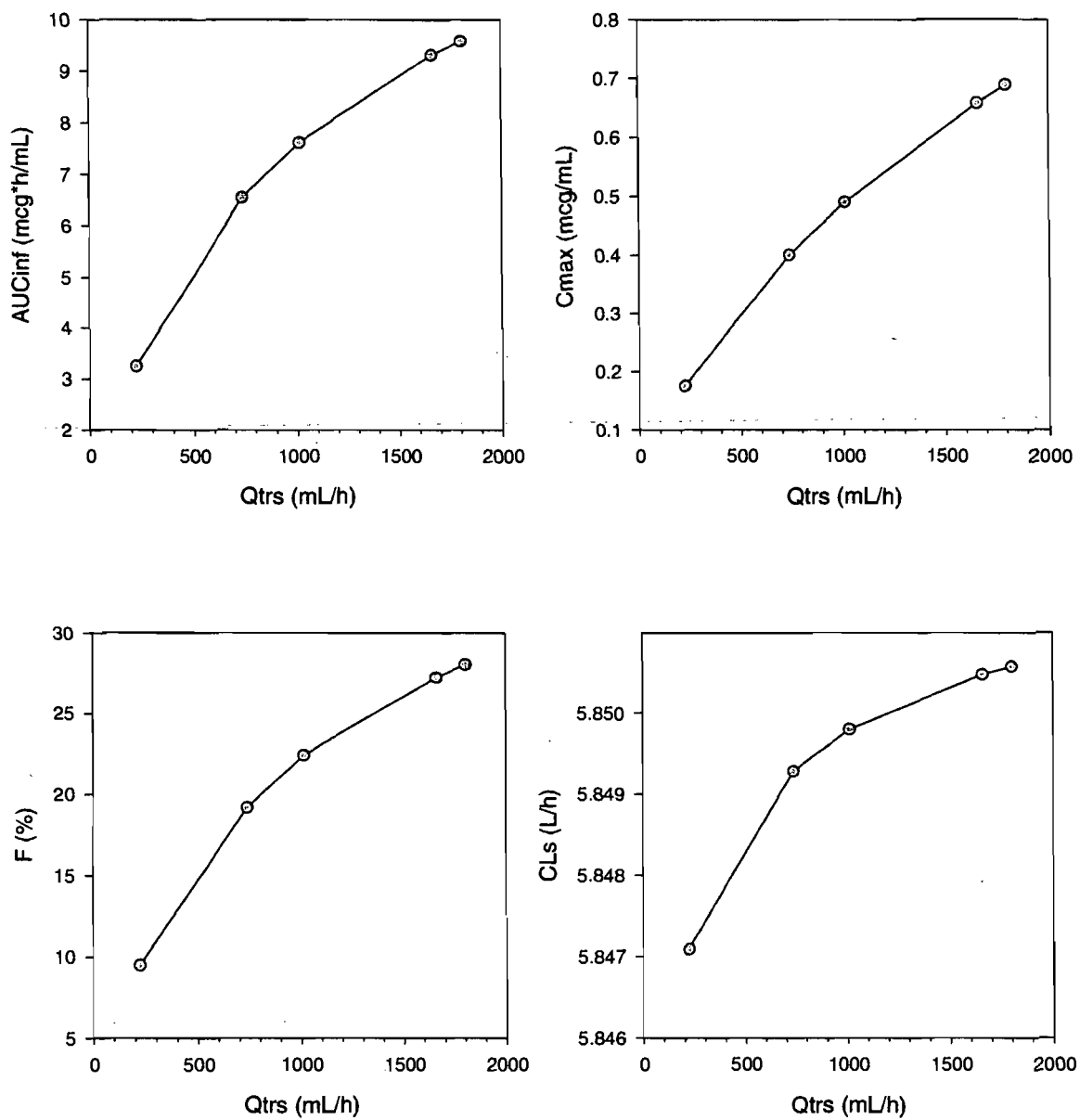


Figure 12: Effect of Q_{trs} on the pharmacokinetics of cyclosporine following a 200 mg oral dose

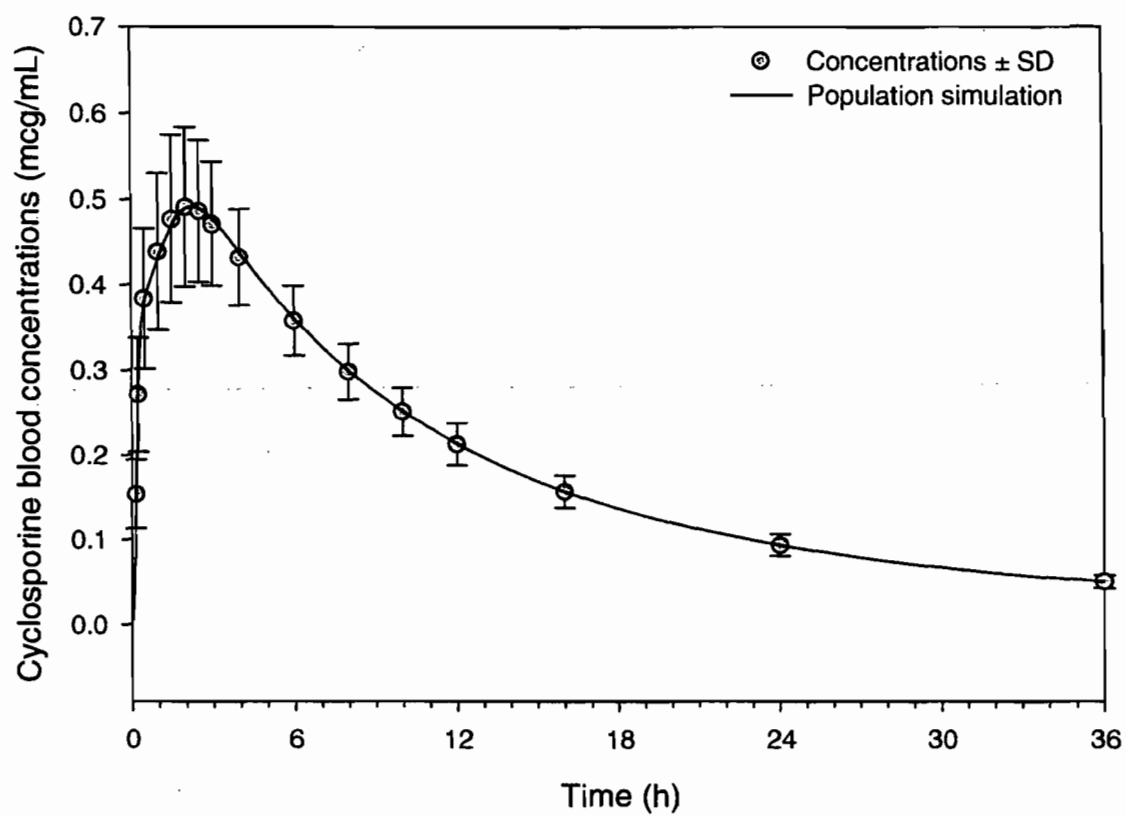


Figure 13: Population simulation of 50 individuals receiving a 200 mg oral dose of cyclosporine for a mean Q_{irs} of 1015 mL/h with a CV of 36%, assuming a normal distribution.

APPENDIX A

Caco-2 cell transport model

Data from apical-to-basal and basal-to-apical experiments were fitted simultaneously with the following set of differential equations. The apical compartment is denoted by the suffix *ap*, the basal compartment by *bas* and the Caco-2 cells compartment by *Caco*.

$$\frac{dC_{ap}}{dt} = \left[\frac{J_{\max} \cdot C_{Caco}}{K_m + C_{Caco}} - P_{ap} \cdot (C_{ap} - C_{Caco}) \right] / V_{ap} \quad (15)$$

$$\frac{dC_{Caco}}{dt} = \left[\frac{-J_{\max} \cdot C_{Caco}}{K_m + C_{Caco}} + P_{ap} (C_{ap} - C_{Caco}) - P_{bas} (C_{Caco} - C_{bas}) \right] / V_{Caco} \quad (16)$$

$$\frac{dC_{bas}}{dt} = P_{bas} (C_{Caco} - C_{bas}) / V_{bas} \quad (17)$$

Where C are concentrations in μM (or pmol/mL), J_{\max} is the maximum flux in pmol/min , K_m is the concentration needed to reach half J_{\max} (in μM), P are permeability coefficient in mL/min and V are volumes in mL .

Absorption model form the gut

Stomach

$$\frac{dC_{st}}{dt} = \frac{-Dose}{250} \cdot Q_{trs} \cdot k_{in} \quad (18)$$

where '250' represents the volume in mL of water taken with the cyclosporine capsule and k_{in} is a switch that turns off once the dose has been transferred to the small intestine.

Gut lumen (1st segment)

$$\frac{dC_{lumen,1}}{dt} = \left[\frac{Dose}{250} \cdot Q_{trs} \cdot k_{in} + \frac{J_{max} \cdot C_{ent,1} \cdot S_{abs}}{k_m + C_{ent,1}} - C_{lumen,1} \cdot Q_{trs} - J_{ap} \cdot S_{abs} (C_{lumen,1} - C_{ent,1}) \right] / V_{lum,1} \quad (19)$$

where V_{lum} is the internal volume of 1 segment of the small intestinal lumen.

Gut lumen (segments i=2-7)

$$\frac{dC_{lumen,i}}{dt} = \left[\frac{J_{max} \cdot C_{ent,i} \cdot S_{abs}}{k_m + C_{ent,i}} - C_{lumen,i} \cdot Q_{trs} - J_{ap} \cdot S_{abs} (C_{lumen,i} - C_{ent,i}) \right] / V_{lum,i} \quad (20)$$

Enterocytes (ent) (segments i=1-7)

$$\begin{aligned} \frac{dC_{ent,i}}{dt} = & \left(\frac{-J_{max} \cdot C_{ent,i} \cdot S_{abs}}{k_m + C_{ent,i}} + J_{ap} \cdot S_{abs} (C_{lumen,i} - C_{ent,i}) - J_{bas} \cdot S_{abs} (C_{ent,i} - C_{plasma,ent,i} \cdot f_{up}) \right. \\ & \left. - \frac{CL_{int,G}}{7} \cdot C_{ent,i} \right) / (V_{gut} \cdot \frac{f_{ent}}{7} \cdot (1 - f_{vvgut})) \end{aligned} \quad (21)$$

where V_{gut} is the gut volume and f_{vvgut} is the fraction of gut vascular space[2].

Plasma compartment associated to the enterocytes (segments i=1-7)

$$\begin{aligned} \frac{dC_{plasma,ent,i}}{dt} = & (Q_{gut} \cdot \frac{f_{ent}}{7} \cdot f_{plasma} \cdot (C_{plasma,art} - C_{plasma,ent,i}) - PS_{bc} \cdot (C_{plasma,ent,i} \cdot f_{up} - C_{u_{bc}}) \\ & + J_{bas} \cdot S_{abs} \cdot (C_{ent,i} - C_{plasma,ent,i} \cdot f_{up})) / (V_{gut} \cdot \frac{f_{ent}}{7} \cdot f_{vvgut} \cdot f_{plasma}) \end{aligned}$$

(22)

where Q_{gut} is the blood flow going the gut, f_{plasma} is the volumic fraction of plasma in blood (set to 0.6), $C_{plasma,art}$ is the drug concentration in the arterial blood plasma and f_{up} is the fraction unbound in plasma (0.06). The PS_{bc} parameter is the permeability coefficient between red blood cells and plasma and Cu_{bc} is the free fraction of drug in red blood cells, as defined by Kawai and Rowland [2],

Red blood cells (bc) compartment associated to the enterocytes (segments $i=1-7$)

$$\frac{dC_{bc,ent,i}}{dt} = (Q_{gut} \cdot \frac{f_{ent}}{7} \cdot f_{bc} \cdot (C_{bc,art} - C_{bc,ent,i}) + PS_{bc} \cdot (C_{plasma,ent,i} \cdot f_{up} - Cu_{bc})) / (V_{gut} \cdot \frac{f_{ent}}{7} \cdot f_{vvgut} \cdot f_{bc}) \quad (23)$$

where f_{bc} is the volumic fraction of hematocrit in blood (set to 0.4), $C_{bc,art}$ is the drug concentration in the arterial red blood cells.

Chapitre 6

Comparison of Different Population Pharmacokinetic Methods

Étude comparative de différentes méthodes d'analyse compartimentale de population

Manuscrit à être soumis à Pharmaceutical Research

6.1 Préambule à l'étude comparative de différentes méthodes d'analyse pharmacocinétique compartimentale de population

Après avoir comparé l'allométrie à la modélisation physiologique et construit un modèle d'absorption intestinale pour la cyclosporine, on s'intéresse maintenant à la comparaison de différentes méthodes de modélisation pharmacocinétique compartimentale de population. Il existe bien des méthodologies pour l'analyse compartimentale de population. Nous avons choisi pour l'étude comparative des méthodes qui sont largement utilisées dans le domaine de la pharmacocinétique, particulièrement dans l'industrie. Cela n'exclut pas que d'autres méthodes pourraient être tout aussi valables et potentiellement supérieures selon les situations, mais leur usage n'est pas encore très répandu dans l'industrie. Deux types de méthodes retiennent notre attention parmi celles que nous n'avons pas incluses : les méthodes non paramétriques et les méthodes calculant une valeur exacte de la vraisemblance jointe (L) (voir la section 2.1.4 aux pages 22-26 pour une description de L).

Mentionnons d'abord les méthodes dites non paramétriques car elles ne supposent aucune distribution statistique des paramètres pharmacocinétiques. Pour cette raison, ce type de méthodologie offre entre autres avantages sur les méthodes paramétriques, la capacité de détecter des sous populations dont on ne soupçonne même pas l'existence, car nul besoin d'avoir recourt à des covariables. On pense par exemple aux polymorphismes génétiques de certains enzymes. Une méthode non paramétrique ne sera pas biaisée par l'hypothèse d'une seule valeur moyenne de clairance pour la population comme c'est le cas pour une méthode paramétrique. Par contre, un avantage que les méthodes paramétriques ont sur les méthodes non paramétriques est qu'elles permettent de distinguer entre les différentes sources de variabilité (inter et intra individuelle), ce qui n'est pas possible avec les méthodes non paramétriques. Les méthodes non paramétriques semblent toutefois donner de très bons estimés des effets fixes. Les deux méthodologies sont en fait complémentaires et gagneraient probablement à être utilisées ensembles [1, 2].

Ensuite il y a les méthodes calculant une valeur exacte de la vraisemblance jointe (L) que nous n'avons pas considérées dans l'étude comparative. Comme il est mentionné au chapitre 2, les méthodes paramétriques classiques font une approximation dans le calcul de L en faisant une expansion en série de Taylor. Les méthodes dites exactes ne font pas nécessairement l'intégration complète de l'équation de L mais la calcule par d'autres moyens mathématiques. Par exemple la méthode développée par R.J. Bauer, MC-PEM (Monte Carlo Parametric Expectation Maximization), génère de façon aléatoire une série de vecteurs de paramètres individuels (typiquement 1000 à 3000) pour obtenir la moyenne et la variance conditionnelles des paramètres à partir de l'échantillon simulé. Ce type de méthodologie requiert un temps d'analyse plus long mais semble donner de meilleurs estimés des moyennes et des variances de population [3, 4].

Notre étude comparative avait pour but de comparer certaines méthodes dans le but d'en optimiser l'utilisation. L'analyse compartimentale par des méthodes de population est un domaine en constante évolution. Les logiciels que nous avons utilisés au cours de cette étude continuent de se raffiner et il existe maintenant de nouvelles versions pour ADAPT II et NONMEM. Leur fondement est cependant le même. Les méthodes brièvement évoquées aux deux paragraphes précédents connaîtront sûrement aussi d'autres développements. L'étude comparative qui suit a le mérite de comparer les méthodes sur un grand nombre de modèles structuraux, ce qui n'avait jamais été fait auparavant.

COMPARISON OF DIFFERENT POPULATION PHARMACOKINETIC METHODS

Julie Grenier^{1,2}, Jean Lavigne¹, Jacques Turgeon², Philippe Colucci², Murray P. Ducharme^{2,3}

1. MDS Pharma Services, Montreal, Canada

2. Faculté de Pharmacie, University of Montreal, Montreal, Canada

3. Cetero Research, Cary, NC

Correspondance and offprints: Murray P. Ducharme, CSO, Cetero

[REDACTED]

6.2 Abstract

Background and objective: Numerous population pharmacokinetic analyses tools are available and it is important to know which ones are more appropriate depending on the type of data. The aim of this study was to compare the performance of different parametric population methods under different study designs in order to determine their strengths and weaknesses.

Methods: A total of 46 studies were simulated to illustrate different study designs with varying types of sampling, number of subjects, route of administration, number of compartments and the matrix in which the drug is being measured. Simulated data were used in order to be able to compare estimates with true values, which is impossible with real data. The population pharmacokinetic analysis tools tested in this project were Standard-Two-Stage (STS) and Global-Two-Stage (GTS) methods using ADAPT-II® release IV software as well as mixed-effect modeling approaches with Iterative-Two-Stage (IT2S®), NONMEM® Version V (NMV), using the First-Order (FO) and First-Order-Conditional-Estimates (FOCE) estimation methods, and the population module of Kinetica™ (Version 4.3). The scientist performing the fitting was blinded to the PK parameters values but knew the structural model and the statistical distribution of the parameters ahead of time. Methods were evaluated for their ability to estimate the population mean and variance of the pharmacokinetic parameters, the individual pharmacokinetic parameters as well as the residual variability.

Results: Mean population pharmacokinetic parameters were generally well estimated by all methods. Population variance of the pharmacokinetic parameters was the least precisely estimated. Where a method had a tendency to overestimate the population variance, the residual variability tended to be underestimated and *vice versa*. Population mixed-effect methods had a net advantage over standard methods for individual pharmacokinetic parameters estimates. IT2S® was negatively affected by sparse sampling compared to NONMEM®. It was not as affected by the number of compartments. What is more surprising is that for both methods, a normal distribution of the pharmacokinetic parameters led to better results compared to a log-normal distribution.

Conclusion: NONMEM® consistently appeared as the superior method, although all methods presented advantages at different points. Our study gave some further insights, especially for the use of IT2S® vs NMV, which appeared to be the 2 best methods of the ones compared.

6.3 Introduction

The use of population pharmacokinetic (PK) analysis has increased over the years. In order to extract the maximum information from this type of analysis, one has to know the assumptions that are made and the limitations of the tools being used. In this study, we restricted the comparison to parametric methods, i.e. when a certain statistical distribution is assumed for the pharmacokinetic parameters. The pharmacostatistical models used by these methods have a hierarchical structure where the first level describes the structural pharmacokinetic model within an individual and the second level describes the relation between individuals.

Among the available parametric population methods, we chose commonly used methods that use different approaches to derive the population parameters. Some derive the population values directly from the individual results like the standard-two-stage (STS) and global-two-stage (GTS) methods. Other methods use a mixed-effect approach adding the inter- and intra-subject variability of the pharmacokinetic parameters as the second level in the model. The iterative 2-stage (IT2S®) and Kinetica™ methods start with individual results like STS and GTS but give refined estimates by integrating the population values (mean and variance) in their bayesian objective functions and by reevaluating the population values at each iteration. The NONMEM® (non-linear mixed-effect modeling) software goes the opposite way by directly fitting the population as a whole and derives the individual estimates as a second step using a Bayesian approach.

Some of these methods have been compared in the past. Comparisons have been made to look into the ability of different methods to fit either simulated data [2, 4-13] or real clinical data [8, 14-23]. STS and NONMEM® have been the most often compared methods [5, 8-12, 14, 17, 18, 23]. In all of the studies reviewed, whether using simulated or real clinical data, the number of models compared has been limited. For clinical data, it is obvious that the amount of data

available is limited by ethical and practical reasons. In addition, the 'true' values of PK parameters are never known. As for simulated data, the amount of data to be generated depends on the questions to be answered. To the best of our knowledge, this type of comparison between different population PK methods using as much simulated data, 46 different studies has never been done.

The purpose of this study was to evaluate the performance of different population pharmacokinetic methods in identifying the true values for the population mean and variance of the PK parameters, the residual variability and the individual PK parameters, assuming the structural PK model and statistical distribution of the PK parameters were known. A total of 46 studies were simulated to illustrate different study designs. Simulated data were used in order to be able to compare estimates with true values, which is impossible with real data. The population PK analysis tools tested in this project were STS and GTS using ADAPT-II® release IV software as well as mixed-effect modeling approaches with IT2S®, NONMEM® Version V (NMV), using the FO and FOCE estimation methods, and the population module of Kinetica™ (Version 4.3). Having used extensively all these methods in the past, our hypothesis was that the two best methods would be NMV and IT2S®. Among these two, our hypotheses were that NMV would be better in sparse sampling situations and when the number of patients to be fitted would be large (e.g. greater than 25), while IT2S® would be better in rich sampling situations and with a small number of subjects (e.g., 24 or less).

6.4 Methodology

6.4.1 *Simulation of the studies*

A total of 46 studies were simulated to illustrate different study designs. Studies differed in terms of number of subjects (6 to 200), route of administration (intravenous (IV) or oral (PO)), type of sampling strategy (rich or sparse), matrix in which the drug was being measured (plasma or plasma+urine) and number of compartments (1, 2 or 3). The PK parameters were simulated with either a normal (N) or a log-normal (logN) distribution and with a population coefficient of variation (CV%) ranging between 9% and 113%. The sampling in plasma and/or urine was

either sparse or rich. Sparse sampling was defined as fewer samples than the number of parameters to be estimated per subject. In studies simulated with sparse sampling, the number of plasma data points was between 2 and 6 for each subject and 2 or 3 for urine data and the ratio number of data points vs number of parameters to be estimated was between 0.5 and 0.86. Sampling times were not necessarily the same for all subjects within a study and were distributed so that overall all phases of the pharmacokinetic profile were well characterized. For studies with rich sampling, the ratio number of data points vs number of parameters to be estimated was between 1 and 5.7. Two studies were simulated using a 1-compartment PK model, 39 studies with a 2-compartment PK model and 5 with a 3-compartment PK model. For oral administration, the absorption followed a first-order process. Table I presents a summary of the study designs simulated.

The studies were simulated using the population simulation module of ADAPT-II® release IV by giving the population mean and variance of the PK parameters. Concentrations were simulated directly with residual variability (output noise). Pharmacokinetic parameters were simulated without covariance.

The scientist doing the fitting was not the same as the one simulating the data and was therefore blinded to the true values as in a 'real' situation. The information known by the scientist doing the fitting were the structural PK model (e.g. 1, 2 or 3 compartments) and the parameters' statistical distribution (normal or log-normal). Errors due to model misspecification were therefore excluded. In order to be fair to all methods, all fittings were started by giving 1 as a starting value for all parameters.

6.4.2 *Tested methods*

Methods used in this paper all use maximum likelihood (ML) estimation techniques in addition to maximum a posteriori (MAP) probability for some of them and have all been described previously in the literature as we will see below. The residual variability was simulated and fitted with a combination of an additive and proportional error model.

6.4.2.1 STS and GTS

The STS and GTS approaches were implemented using ADAPT-II® release IV software, with the ML estimation algorithm [24]. With these two methods, data for each subject are fitted separately and there is no population information within the objective function. We performed the STS in 2 different steps. Firstly, we imputed general priors (e.g. CL=1 L/h, Vc= 1L, etc.) and fixed the residual variability to a small value so that better priors would be generated. The PK parameter values obtained from this first set of iterations were then used as new prior values for the second and final step where both residual variability and PK parameters were being simultaneously fitted. Among the publications describing the STS methodology, the reader can refer to Sheiner [9]. What we call the GTS estimation is not the one described by Prévost [25] and Steimer [5] but consists of repeating the maximum likelihood estimation, changing priors to the results obtained from the previous iteration and this until the final results do not vary from the priors. The choice of the best run is then based on the Akaike criterion. Note that values given as *a priori* were the same for all subjects. For both STS and GTS, the mean population PK parameters and their variance as well as the residual variability were obtained by combining the individual estimates and taking the mean and variance of the set of individual estimates.

6.4.2.2 IT2S®

IT2S® is an extension of the STS methodology and stands for "iterative 2-stage" method. It is a population method using Bayesian and ML estimation [13, 26], based on modules from ADAPT-II® release III and on the work of Prévost [25] and Steimer [5]. In this study, initial estimates of population mean and variance for each pharmacokinetic parameter were obtained by the STS method described previously. During the first population iteration, the individuals are fitted with a ML approach as presented in the STS method. Starting with the second population iteration and until convergence is achieved, refined estimates of the population mean and variance of the PK parameters are computed from the individual values obtained from the previous population estimation. A MAP-Bayesian estimation of PK parameters is performed using these values as the new population priors. Population iterations are repeated until results

converge. At pre-selected population iterations (e.g., 10, 30, 60, 100, 150) the residual variability (the additive and proportional component of the error) are updated by ML estimation until they become stable. In this study, results were considered as converged when population estimates varied by no more than 1% for at least 200 consecutive population iterations.

6.4.2.3 NONMEM[®]

NMV uses a different methodology than IT2S. Although all individuals remain identifiable, the data from all subjects are combined and fitted together using an extended-least-squares estimation. Post-hoc individual PK parameters are derived in a second step using a MAP-Bayesian algorithm. Among the important literature on the NMV methodology, we can refer the reader to the user's manual [27] and some selected publications of Drs. Beal and Sheiner [10-12].

Data from all individuals are fitted together so the objective function to minimize is the combination of the individual likelihood functions that takes the form of an integral. In the pharmacokinetic context where the equations are non-linear with respect to the parameters, the maximization of such a function is difficult because there is no analytical solution to the integral. The maximum likelihood function has to be simplified in order to achieve the parameters' search. In NMV, few methods are available that differ by the way they approximate the integral of the maximum likelihood equation [28]. We used two of these options in this study. The first-order estimation method (FO) and the first-order conditional estimation method (FOCE).

6.4.2.4 Kinetica[™]

Kinetica[™] (version 4.3) uses the EM algorithm [29-32], a two-step algorithm represented by the E (Expectation) and M (Maximisation) steps. Given current values of population parameters and conditional on the observed data vector, expected values of individual parameters are obtained during the E-step. Kinetica[™] also uses a MAP Bayesian fitting procedure to evaluate the probability of the individual estimated values conditionally on the population values and individual available information. The purpose of the M-step is then to obtain the maximum

likelihood posterior population mean and variance together with the residual error variance, given the individual parameter values obtained during the E-step. As for other methods previously described, only an approximation of the maximum likelihood function is obtained. The iteration stops when the M-step converges, that is, until the difference between successive estimates is sufficiently small. This criterion is set by the user and a value of 0.001 was used.

It is important to note that we wanted to use a combination of additive and constant CV error model for the residual variability to fit with what we know was simulated. However, due to a software limitation with the version of Kinetica™ we had, the constant portion of the error model could not be fitted and had to be fixed by the user. In addition, plasma and urine data could not be fitted simultaneously within the population module of Kinetica™ Version 4.3, the objective function being defined for one type of observation only. Because of this limitation, it was decided to evaluate this software only for studies with plasma data.

6.4.3 Performance criteria

Four types of estimates were evaluated: the pharmacokinetic parameters' population mean and variance, the residual variability and the individual estimates. For each study, the %bias and %precision were calculated for the four types of estimates for each parameter as follows:

$$bias = Median_{i=1}^n \left[\frac{estimated_i - true_i}{true_i} \right] * 100$$

and

$$precision = Median_{i=1}^n \left[\frac{|estimated_i - true_i|}{true_i} \right] * 100$$

The bias and precision for a given study were then calculated as the median of the individual bias and precision of all parameters and were used as a comparison point for individual estimates, population mean, population variance and residual variability. We reported the median bias and precision because the arithmetic mean was too sensitive to outlier values. In the case of individual estimates, for each study, the median is calculated from all parameter

estimates of all subjects. In order to simplify the text, we will refer to the median precision and median bias of each study simply as their precision and bias.

6.5 Results

A summary of the precisions obtained for all types of estimates is presented in Table 2.

6.5.1 Population mean estimates

The population mean pharmacokinetic parameters were generally well estimated by all 6 methods. From best to worst performance, methods were in order: FOCE, FO, IT2S, Kinetica, GTS and STS. The average precision among all studies were approximately 30% for the population mixed-effect methods (FOCE, FO, IT2S and Kinetica) and approximately 50% for STS and GTS. The median precision ranged from approximately 10% for FOCE to 30% for STS. The FO method was similar to FOCE, while Kinetica was similar to STS in terms of precision. IT2S and GTS gave median precisions of approximately 20%.

6.5.2 Individual estimates

The precision of individual PK parameter estimates were not as good. The median precision ranged approximately from 10% for FOCE and FO, 25% for IT2S, 30% for Kinetica, 30% for GTS and 40% for STS.

6.5.3 Population variance and residual variability estimates

The population variance estimates were the least precise. From best to worst, the methods were, in order: FO, FOCE, Kinetica, IT2S®, STS and GTS. FOCE and FO gave median and average precisions of approximately 85% and 135%, respectively. GTS and STS gave median precisions of approximately 1600% and 1400%, respectively. On the other hand, the plasma residual variability was the parameter estimated with greatest precision for population mixed-effect methods. From best to worst, the methods were, in order: the 2 NMV methods with median and mean precisions of approximately 10%, IT2S® with median and average precisions

of approximately 20% and 35%, respectively, and finally Kinetica with median and mean precisions of approximately 45% and 240%, respectively. The urine residual variability estimates were less precise than plasma. The average and median precisions for the NMV methods were approximately 165% and 20%, respectively. For IT2S[®] average and median precisions were approximately 50%. The median precisions for GTS and STS methods were similar to IT2S[®] but the averages were approximately 100% for GTS and 200% for STS. To summarize, from best to worst for the plasma residual variability estimates, methods were: FOCE, FO, IT2S[®], STS, GTS and Kinetica. For urine residual variability the order was: FOCE, FO, IT2S[®], GTS and STS.

We also looked at the estimation of the variance parameters into more details, both intra- and inter-subject, and made interesting observations. Figures 1a and 1b represent the median %bias on the Vc and CL population variability estimates for all methods and figure 1c represents the median %bias on the plasma residual variability estimates. The GTS and STS methods almost systematically overestimated the population variability on the PK parameters but underestimated the plasma residual variability. IT2S[®] was less biased than GTS and STS on the population and residual variabilities but was showing the same trend. Kinetica[™] showed the opposite trend, i.e. that it underestimated the population variability but overestimated the plasma residual variability. The 2 NMV methods were the ones with the least bias and there was no definite trend in either overestimating or underestimating the variability. Figures 1d and 1e show the same type of data but for urinary parameters, i.e. population variability for CLr and urine residual variability. The same trend as mentioned above for plasma parameters is also observed for urinary data.

6.5.4 *Relative performance of methods compared to the best ones*

Individual estimates often being the estimates of interest, it prompted us to analyze in more detail the performance of the different methods. For each study, the method giving the best results was first identified based on the median precision of individual pharmacokinetic parameters' estimates. For each study, the results of the best method then became the

reference values and the relative performance of the other methods was then assessed and compared to the results of the best method. All methods had a minimum value of 0%, meaning that each method was the best one for at least one study. FOCE was the best method more frequently and had a median relative precision of 0%. The GTS and STS methods were the least precise as per their mean (36% and 40%) and median (31% and 40%). Interestingly, however, they were the most stable methods if we look at the maximum value (no more than 100%) and the %CV (84% and 73%) on the relative %precision. On the other hand, although the FOCE and FO methods appeared as the best and second best for individual estimates, based on the median and mean of the relative %precision, they were the least stable methods with %CV of 306% and 296%, respectively.

6.5.5 Comparison of NONMEM® and IT2S®

We compared more extensively FOCE and IT2S®. With the study designs used, the FOCE and FO methods from NMV led to very similar results and so we felt that there was no need to compare them into more details. IT2S® was chosen to be compared to NMV because it appeared to be the best method, other than NMV, among the ones tested in terms of overall performance.

We investigated graphically if FOCE and IT2S® behaved differently depending on the type of administration (PO vs IV), the number of subjects (from 6 to 200), the number of compartments (1-3), the type of sampling (rich or sparse), the parameters' distribution (normal or log-normal) and the type of matrix (plasma or plasma+urine). Figures 2-5 show the factors that were found to influence the most the precision for individual estimates. Figure 2 shows that the type of sampling did not have much influence on the performance of FOCE. The median precisions were 8% and 12% for rich and sparse sampling, respectively. The performance of IT2S® was however clearly decreased with sparse sampling with a median precision of 46% vs 11% for rich sampling. Furthermore, the number of subjects alone was not a determinant factor but trends are observed when coupled with the type of sampling (Figure 3). With a rich sampling and a limited number of subjects (≤ 24), FOCE and IT2S® gave almost identical results. However,

using a greater number of subjects worsened the precision for IT2S[®]. With sparse sampling, FOCE was slightly less precise compared to rich sampling regardless of the number of subjects. IT2S[®] however clearly gave less precise estimates with sparse sampling designs and this is emphasized with less subjects. Although an increasing number of subjects improved the precision on individual estimates for IT2S[®], it did not compensate for the deficiency in the number of samples per individual.

Figure 4 shows that when the pharmacokinetic parameters had a normal distribution, both methods gave reasonable precisions with median precisions of 9% for FOCE and 15% for IT2S[®]. However, when the parameters had a log-normal distribution, IT2S[®] became much less precise with a median precision of 59% and took much more iterations to converge. The behavior of the 2 methods in relation with the number of compartments was also explored. In general, both methods became less precise as the number of compartments increased but not in the same manner. Figure 5 shows that FOCE and IT2S[®] gave a similar precision for a 1-compartment model, 5% and 7%, respectively (note that there were only 2 studies with a 1-compartment model). When going to a 2-compartment model, FOCE still gave very good precisions (median of 9%) but the median precision for IT2S[®] increased to 23%. However, for 3-compartment models, FOCE became slightly less precise than IT2S[®] with median precisions of 36% and 32%, respectively. No other trend was observed with the other factors (type of administration, the number of subjects and the sampling matrix), taken alone or in combination. The trend for IT2S to be similar or better than NMV for a 3-compartment or possibly more complicated models would need to be investigated further.

6.6 Discussion

Overall, our results demonstrate that mixed-effect modeling approaches are generally better than standard methods like STS and GTS, a finding in accordance with previously published comparison studies with STS, using simulated data. What is more surprising is how the number of subjects did not have a significant impact on the quality of the results for mixed-effect methods as compared to other factors. The type of sampling, i.e. rich or sparse sampling,

appears to be determinant in our study designs, especially with IT2S. Interestingly, where a method has a tendency to overestimate the inter-subject variability (STS, GTS and IT2S®), it underestimates the intra-subject variability. The opposite is also true for Kinetica™.

Sheiner and Beal have compared NONMEM® to STS for 3 types of structural model: Michaelis-Menten, monoexponential and biexponential models, using simulated data [10-12] and Grasela et al. [14] used clinical data. For these models, the population mean estimates (fixed effects) were good for both methods but a major difference was seen with the estimation of the variability parameters. Similar to our findings, the authors found that STS overestimated the inter-subject variability. In addition, the greater the intra-subject variability was, the greater was the overestimation [12]. Such a tendency was not observed throughout our study, probably due to the numerous study designs used. Within our datasets, the determinant factor with regards to STS, was whether the sampling was rich or sparse, the later giving less precise estimates.

We also tested the GTS method which differs from STS in that the estimated population mean and residual variability are used as priors for the next iteration. However, these parameters are not part of the objective function. Results presented in Table 2 show that GTS offers only a small advantage over STS for individual estimates. In addition, Figure 1 shows that STS may actually be better for estimating the residual variability. Therefore, use of the population mean parameters as prior values given to the minimization algorithm is not sufficient to improve the estimates. Therefore, one should not spend too much time on repeating the GTS cycle if results are similar to the initial STS estimates.

A net contrast in the precision attained with FOCE and IT2S® in sparse sampling situations was observed. For studies with sparse sampling, FOCE had a net advantage over IT2S® for individual estimates but both methods were suitable for study designs with rich sampling. Although our first thought was that the presence of a MAP-Bayesian procedure would allow to properly fit sparse data with both methods [1], it does not appear sufficient for IT2S® based on our data. We may hypothesize that part of the problem comes from the estimation of the variance terms, both from the intra- and inter-subject perspective. As seen in Figure 1, IT2S®

generally overestimated the inter-subject CV% and underestimated the intra-subject CV% (residual variability), which are both part of the objective function. As mentioned previously, it is known that STS overestimates the inter-subject variability and may add this uncertainty for each individual PK parameters estimates to the real biological variability between subjects [14]. Sheiner and Beal [12] had shown that for a fixed total number of data points, STS was definitely favored by an increasing number of data points per subject, which was not the case for NONMEM[®]. It can be expected that there is more uncertainty in an individual fit with sparse data compared to rich data. If this uncertainty is carried out in the between subjects variability estimates of IT2S[®], this later will also overestimate the between subject variability. An overestimation of the between-subject variability then allows a broader range of possible parameter values of individual estimates. We found that IT2S was much better with rich sampling data than sparse data, so it seems that there may be a carryover of this intrinsic limitation of the STS methodology. But still, IT2S[®] gave much better estimates than STS and GTS. However, IT2S[®] did not appear as robust as what we hypothesized on the residual variability. This may be the result of how we update the residual variability estimates at selected population iterations only. The performance of IT2S should be further evaluated but by updating the residual variability at each population iteration to see if it would improve or worsen its performance. The FOCE estimates on the other hand were unbiased overall. In contrast to IT2S, Kinetica[™] generally underestimated the inter-subject variability and it often gave back individual estimates that were almost the same for all subjects, which was bothersome.

Over the years, we have come across numbers of complex models that NONMEM[®] was not able to fit but that IT2S[®] could. In our study, FOCE tended to lose its advantage over IT2S[®] with increasing number of compartments. Bauer and Guzy [3] had similar experience when they compared their Monte Carlo Parametric Expectation Maximization (MC-PEM) method with FOCE. They found that the later had difficulty fitting a 2-compartment PK model linked with a Michaelis-Menten PD model but was extremely good in fitting a simple PK model.

In the NMV user manual [28] (chapter III, part VII, p.10), it is mentioned that the difference in the FO and FOCE estimates should increase with the inter-subject variability. Surprisingly, not

much difference was observed in the precision of the estimates between these two methods. However, we did not study a wide range of variability and for most of our studies, the intra-subject variability was 30% or below. Also, because we studied different study designs, it might have been more difficult to detect. In addition, it has been also proposed in the literature that the improvement with conditional estimation in the ability to approximate random effects is only possible when the number of observations per subject is sufficiently large. Indeed, the absence of significant difference between FO and FOCE-like methods estimates has also been observed in a previous comparative study done by D.J. Roe [2]. This comparative study used two sets of simulated data differing only by the inter-subject variability.

There was no trend in the observed precision to vary as a function of the number of subjects, for any of the methods tested, which is in accordance with what was found by Bustad et al. [33]. The maximum likelihood has been proven to be a consistent estimator, i.e. that an increasing sample size improves the estimates [34]. However, as Bustad et al. have found, most of the parametric methods available use an approximation of the maximum likelihood. They tested the effect of the number of subjects (between 25 and 800) on the precision of the estimates for a simulated study. An increasing number of subjects did not guarantee better results for NMV and IT2S-like methods. In addition, among our simulated studies, the same study was simulated once with 6 subjects and once with 50 subjects (studies 5 and 30 in Table I). The quality of the fit was not necessarily improved with 50 subjects and sometimes even worsened, especially with the FO and FOCE methods. Previous work from Girard and Mentré [4] have shown that methods without approximation of the likelihood showed better performances than others with an approximation. Their method comparison was performed on 100 different datasets of the same population for a one-compartment and first-order absorption.

It was very important in our study that the scientist simulating the studies was not the same as the one fitting the data, because all these methods are sensitive to the values given *a priori*. The ideal but not realistic situation would be a method totally independent of prior values. In opposition to what was done in this study, the true structural model is never known in real life.

Therefore, one should keep in mind that our findings do not take into account the model discrimination process and the effect of model misspecification. However, the intent was to compare the performance of the methods at giving accurate results, not their ability at discriminating between models. In addition, we were then also able to look at the effects of other factors such as the number of subjects, the sampling strategy, the type of drug administration, the number of compartments and the statistical distribution of the pharmacokinetic parameters.

Kinetica™ uses the EM algorithm to fit the data. In terms of analysis time, Kinetica™ was extremely rapid when using a model included in the software package and it possesses very powerful graphic features to evaluate the goodness of fit. The PK models are written with constants of absorption, distribution and elimination. The user can define its own model but there is no option supporting complex models. For example, it is not possible to have a model where both plasma and urine data are fitted simultaneously. In addition, when the user parameterizes the model in terms of clearances and volumes of distribution, it becomes much slower. Of all methods, IT2S® was the slowest because of the nature of the iterative process. It is however the most flexible. It can accommodate a larger number of fitted parameters and highly complex models, written in the form of differential, integrated or matrix equations.

6.7 Conclusion

All methods have their strengths and their weaknesses and no method may be best in all circumstances. A simple STS analysis can be very useful to get preliminary results and this can sometimes be sufficient. In our experience, STS and GTS with ADAPT-II® are also very useful for structural pharmacokinetic model discrimination. However, as it was seen before and with our results, more sophisticated population methods are less biased and more precise, even with rich sampling situations and should generally be preferred. Although individual methods are still very useful to get some rapid preliminary results, the final analyses should preferably be performed with population methods as they give more robust results.

For the types of models used in this study, NMV offered the advantages of giving good results and being rapid. With rich sampling, IT2S[®] also gave acceptable results but the analysis took much more time. The next step in comparing the methodologies presented in this paper would be to test them for models with higher degrees of complexity. The more complex model in our study was a 3-compartment with plasma and urine data. More complex design could be PK/PD models or models including metabolites as well as models including covariates.

6.8 References

1. Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling: parametric and nonparametric methods. *Ther Drug Monit* 2000; 22(3):354-65
2. Roe DJ. Comparison of population pharmacokinetic modeling methods using simulated data: results from the Population Modeling Workgroup. *Stat Med* 1997; 16(11):1241-57; discussion 57-62
3. Bauer RJ, Guzy S: Monte Carlo parametric expectation maximization (MC-PEM) method for analyzing population pharmacokinetic/pharmacodynamic data dans *Advanced Methods of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Systems Analysis*, édité par D'Argenio DZ, Los Angeles: Kluwer Academic Publisher, 2004:135-63
4. Girard P, Mentré F, A comparison of estimation methods in nonlinear mixed effects models using a blind analysis (online). 14th meeting of the Population Approach Group in Europe; 2005 Jun 16-17. Available from <http://www.page-meeting.org/page/page2005/PAGE2005O08.pdf> (Accessed 2009 Jan 13)
5. Steimer J-L, Mallet A, Golmard J-L, Boisvieux J-F. Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model. *Drug Metabolism Reviews* 1984; 15(1&2):265-92
6. Sheiner LB, Beal SL. Bayesian individualization of pharmacokinetics: simple implementation and comparison with non-Bayesian methods. *J Pharm Sci* 1982; 71(12):1344-8
7. Bennett JE, Wakefield JC. A comparison of a Bayesian population method with two methods as implemented in commercially available software. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24(4):403-32

8. Erichsen L, Agbaje OF, Luzio SD, Owens DR, Hovorka R. Population and individual minimal modeling of the frequently sampled insulin-modified intravenous glucose tolerance test. *Metabolism* 2004; 53(10):1349-54
9. Sheiner LB. The population approach to pharmacokinetic data analysis: rationale and standard data analysis methods. *Drug Metab Rev* 1984; 15(1-2):153-71
10. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; 8(6):553-71
11. Sheiner BL, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9(5):635-51
12. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1983; 11(3):303-19
13. Forrest A, Hawtof J, Egorin MJ. Evaluation of a new program for population PK/PD analysis - applied to simulated phase 1 data. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49(2):153
14. Grasela TH, Jr., Antal EJ, Townsend RJ, Smith RB. An evaluation of population pharmacokinetics in therapeutic trials. Part I. Comparison of methodologies. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39(6):605-12
15. Higuchi S, Fukuoka R, Aoyama T, Horioka M. Predicting serum lithium concentration using Bayesian method: a comparison with other methods. *J Pharmacobiodyn* 1988; 11(3):158-74
16. Fernandez de Gatta MM et al. Prediction of imipramine serum levels in enuretic children by a Bayesian method: comparison with two other conventional dosing methods. *Ther Drug Monit* 1989; 11(6):637-41
17. Yu DK, Hutcheson SJ, Wei G, Bhargava VO, Weir SJ. A comparison of population and standard two-stage pharmacokinetic analyses of vigabatrin data. *Biopharm Drug Dispos* 1994; 15(6):473-84

18. Vermes A, Math t RA, van der Sijs IH, Dankert J, Guchelaar HJ. Population pharmacokinetics of flucytosine: comparison and validation of three models using STS, NPEM, and NONMEM. *Ther Drug Monit* 2000; 22(6):676-87
19. Vicini P, Cobelli C. The iterative two-stage population approach to IVGTT minimal modeling: improved precision with reduced sampling. Intravenous glucose tolerance test. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(1):E179-86
20. Schoemaker RC, Cohen AF. Estimating impossible curves using NONMEM. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42(3):283-90
21. Duffull SB, Kirkpatrick CM, Green B, Holford NH. Analysis of population pharmacokinetic data using NONMEM and WinBUGS. *J Biopharm Stat* 2005; 15(1):53-73
22. Spiegelhalter DJ, Myles JP, Jones DR, Abrams KR. Methods in health service research. An introduction to bayesian methods in health technology assessment. *BMJ* 1999; 319(7208):508-12
23. De Gaetano A, Mingrone G, Castageneto M. NONMEM improves group parameter estimation for the minimal model of glucose kinetics. *Am J Physiol* 1996; 271(5 Pt 1):E932-7
24. D'Argenio DZ, Schumitzky A: ADAPT II user's guide to release 4. Los Angeles, CA: University Southern California; 1997
25. Prévost G, Estimation of a normal probability density function from samples measured with non-negligible and non-constant dispersion. Internal report, Adersa-Gerbios, Palaiseau, France,
26. Forrest A, Ballow CH, Nix DE, Birmingham MC, Schentag JJ. Development of a population pharmacokinetic model and optimal sampling strategies for intravenous ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(5):1065-72
27. Boeckmann A, Sheiner BL, Beal SL: Part V: Introductory Guide dans NONMEM Users Guide, édité par California Uo, San Francisco, 1994

28. Beal SL, Sheiner BL: Part VII: Conditional Estimation Methods dans NONMEM Users Guide, édité par San Francisco: University of California, 1998
29. Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. J R Statist Soc 1977; Series B, 39:1-38
30. InnaPhase: Appendix A: population methodology dans Kinetica(TM) Version 43 User Manual, édité par, 2003-2004:A1-A20
31. Laird NM, Ware JH. Random-effects models for longitudinal data. Biometrics 1982; 38(4):963-74
32. Sanathanan LP. Random effects modeling in population: kinetic/dynamic analysis. Drug Info J 1991; 25:307-18
33. Bustad A, Terziivanov D, Leary R, Port R, Schumitzky A, Jelliffe R. Parametric and nonparametric population methods: their comparative performance in analysing a clinical dataset and two Monte Carlo simulation studies. Clin Pharmacokinet 2006; 45(4):365-83
34. Nie L. Strong consistency of the maximum likelihood estimator in generalized linear and nonlinear mixed-effects models. Metrika 2006; 63:123-43

#	# of subjects	# of cpt	Type of administration	Type of sampling	Matrix	PK parameter distribution	#	# of subjects	# of cpt	Type of administration	Type of sampling	Matrix	PK parameter distribution
1	6	1	IV	rich	plasma+urine	N	24	30	2	IV	sparse	plasma	N
2	6	2	IV	rich	plasma	N	25	30	2	IV	sparse	plasma+urine	N
3	6	2	IV	rich	plasma+urine	N	26	30	2	PO	rich	plasma	N
4	6	3	IV	rich	plasma	N	27	30	2	PO	rich	plasma+urine	N
5	6	3	IV	rich	plasma+urine	N	28	30	2	PO	sparse	plasma	N
6	12	2	IV	rich	plasma	N	29	30	2	PO	sparse	plasma+urine	N
7	12	2	IV	rich	plasma+urine	N	30	50	3	IV	rich	plasma+urine	N
8	12	3	IV	rich	plasma	N	31	200	2	IV	rich	plasma	N
9	12	3	IV	rich	plasma+urine	N	32	200	2	PO	rich	plasma	N
10	16	2	IV	rich	plasma+urine	N	33	200	2	IV	rich	plasma	logN
11	18	2	PO	rich	plasma	N	34	200	2	PO	rich	plasma	logN
12	24	1	PO	rich	plasma	N	35	200	2	IV	rich	plasma+urine	N
13	24	2	IV	rich	plasma	logN	36	200	2	PO	rich	plasma+urine	N
14	24	2	IV	rich	plasma+urine	N	37	200	2	IV	rich	plasma+urine	logN
15	24	2	IV	rich	plasma+urine	logN	38	200	2	PO	rich	plasma+urine	logN
16	24	2	IV	sparse	plasma	logN	39	200	2	IV	sparse	plasma	N
17	24	2	IV	sparse	plasma+urine	logN	40	200	2	PO	sparse	plasma	N
18	24	2	PO	rich	plasma	logN	41	200	2	IV	sparse	plasma	logN
19	24	2	PO	rich	plasma+urine	logN	42	200	2	PO	sparse	plasma	logN
20	24	2	PO	sparse	plasma	logN	43	200	2	IV	sparse	plasma+urine	N
21	24	2	PO	sparse	plasma+urine	logN	44	200	2	PO	sparse	plasma+urine	N
22	30	2	IV	rich	plasma	N	45	200	2	IV	sparse	plasma+urine	logN
23	30	2	IV	rich	plasma+urine	N	46	200	2	PO	sparse	plasma+urine	logN
Total							3842	2x1cpt 40x2cpt 4x3cpt	28 IV 18 PO	16 sparse 30 rich	22 plasma 24 p+urine	30 N 16 logN	

Table 1 - Summary of the different simulated studies

	FOCE	FO	IT2S	KINETICA	GTS	STS
Individual parameters						
Median	9.2	10.7	24.2	29.0	29.7	41.5
Mean	20.3	31.9	35.6	36.9	37.8	40.9
%CV	135	201	85.7	78.4	75.9	68.5
Population mean						
Median	7.8	9.6	21.9	27.6	20.3	28.0
Mean	29.5	31.4	31.6	31.6	51.9	55.2
%CV	135	122	113	88.9	195	148
Population variance						
Median	85.8	85.9	152	96.4	1623	1369
Mean	135	131	756	210	729372	201223
%CV	185	187	147	187	493	458
Plasma residual variability						
Median	6.6	7.96	17.3	43.9	29.0	26.9
Mean	12.4	13.2	35.5	244	1027	97.4
%CV	125	124	95.5	310	514	314
Urine residual variability						
Median	17.4	18.7	43.6	-	40.5	43.5
Mean	164	168	50.6	-	98.3	213
%CV	385	377	71.3	-	178	189
N	46	46	46	22	46	46

Table 2 –Precision of estimates

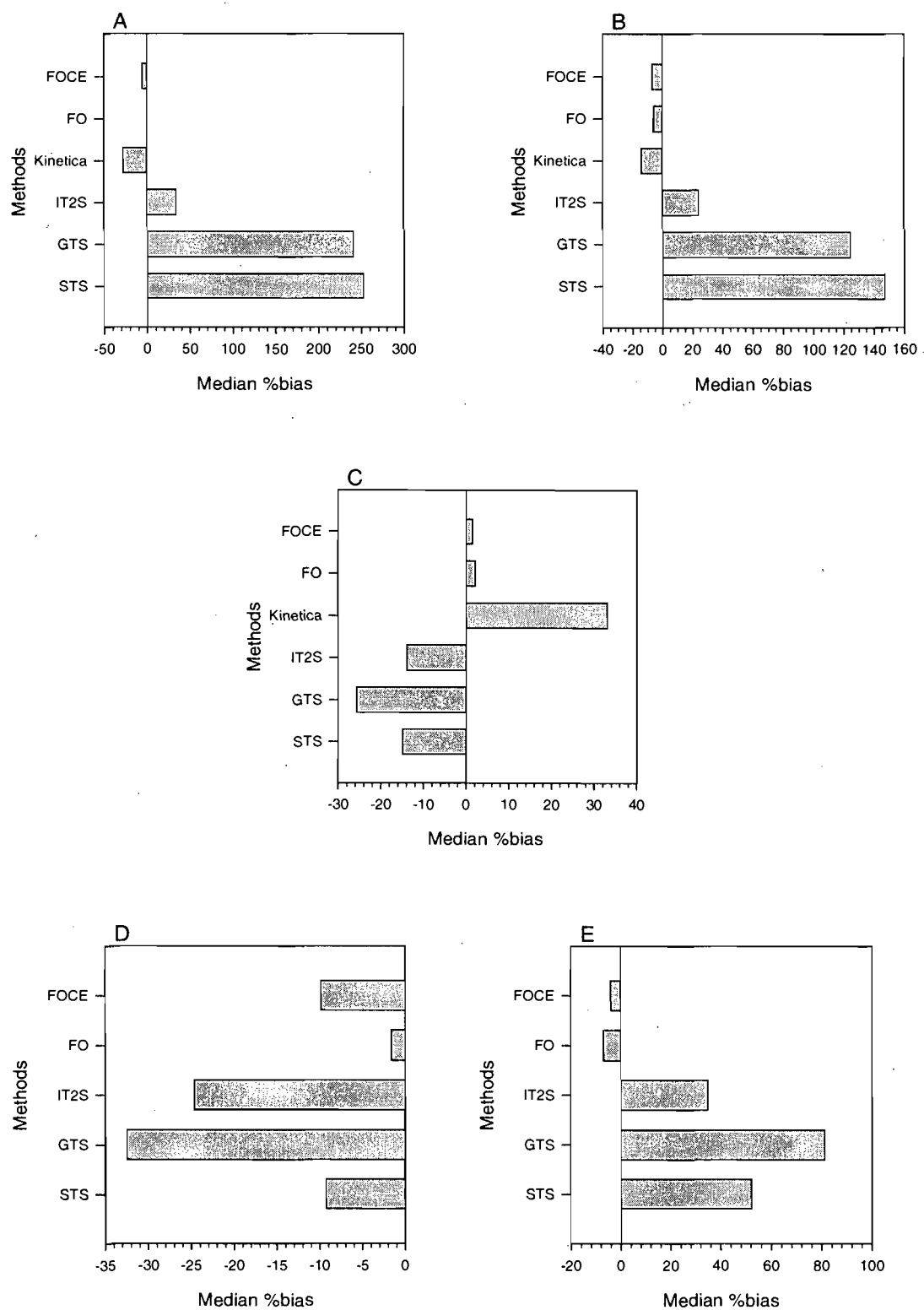


Figure 1: Median %bias on variability estimates for each method. A) Vc population variability, B) CL population variability, C) plasma residual variability, D) urine residual variability, E) CLr population variability

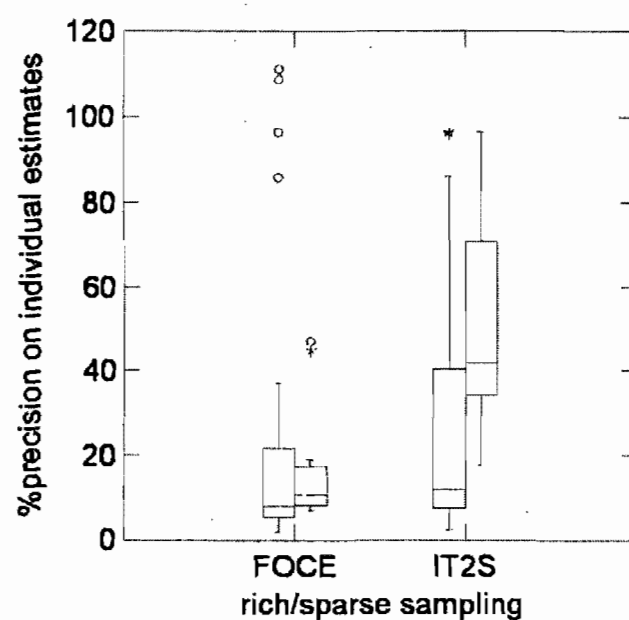


Figure 2: Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods. For each method, the left box is for studies with a rich sampling and the right box is for studies with a sparse sampling.

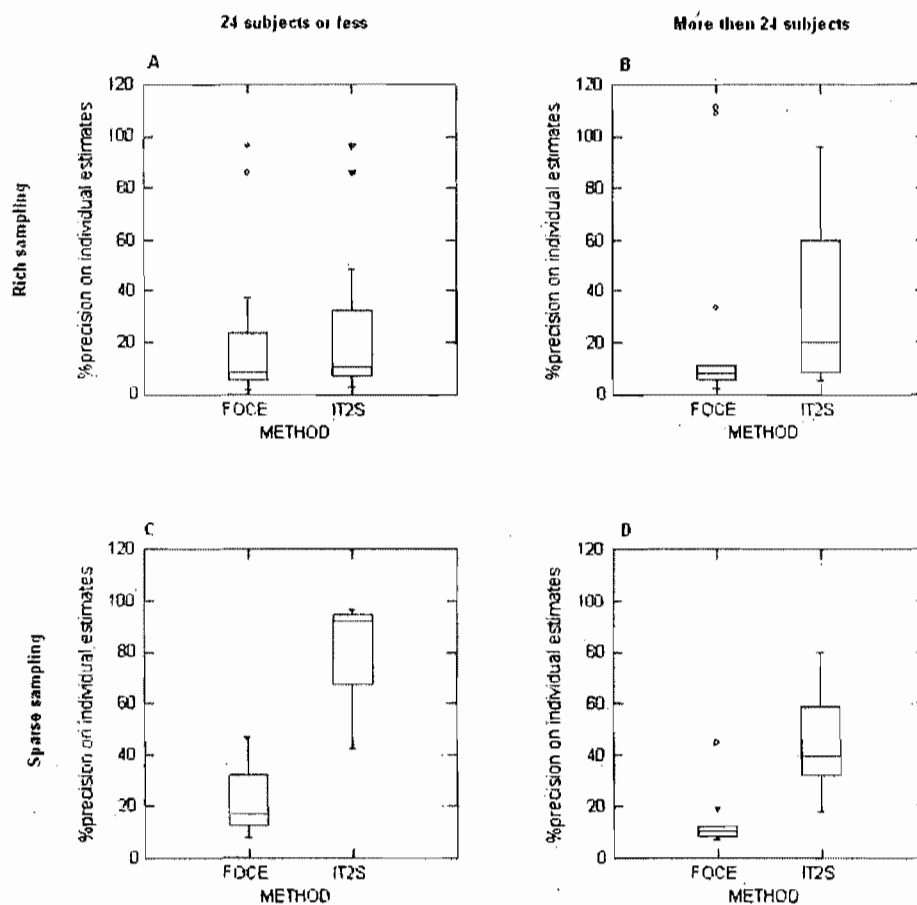


Figure 3: Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods by type of sampling and number of subjects sub-groups.

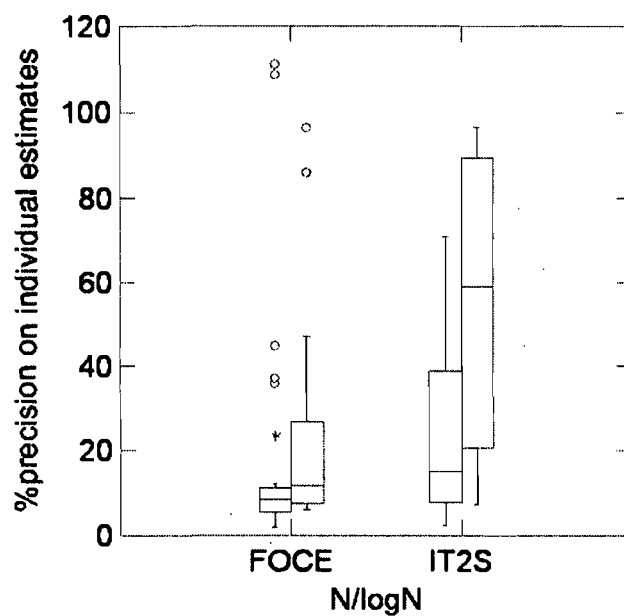


Figure 4: Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods. For each method, the left box is for studies with a normal distribution for the PK parameters and the right box is for studies with a log-normal distribution for the PK parameters.

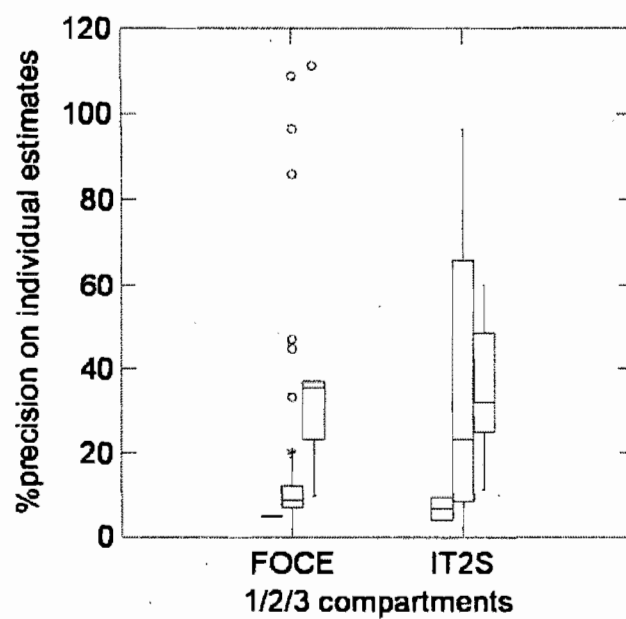


Figure 5: Precision on individual estimates for FOCE and IT2S methods. For each method, the left box is for studies with a 1-compartment model, the center box is for studies with a 2-compartment model and the right box is for studies with a 3-compartment model.

Chapitre 7

Discussion générale et conclusion

Le sujet de cette thèse portait sur l'optimisation de l'utilisation de la modélisation dans le cadre du développement du médicament, plus particulièrement lors du passage entre les études pré-cliniques et les études cliniques. À cette fin, deux études comparatives ont été réalisées. La première, présentée au chapitre 5, comparait l'allométrie à la modélisation physiologique avec la cyclosporine comme médicament modèle. Au cours de cette étude, nous avons construit un modèle pharmacocinétique physiologique pour décrire l'absorption intestinale de la cyclosporine. Afin d'obtenir des données pharmacocinétiques de cyclosporine chez l'humain dans le but de valider le modèle PBPK, une étude portant sur l'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberge a été réalisée (Chapitre 4). La deuxième étude comparative portait sur différentes techniques utilisées couramment pour la modélisation pharmacocinétique de population. Par l'analyse d'une série de données simulées, nous avons tenté d'identifier quelques éléments clés permettant de déterminer quelles méthodes sont les plus appropriées dans certains contextes donnés (Chapitre 6).

7.1 Interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberge

Bien qu'il existait déjà certaines données pharmacocinétiques sur la cyclosporine dans la littérature, il était plus approprié d'avoir en main les données brutes plutôt que de se rapporter à des concentrations moyennes qui ne donnent qu'une vague idée des profils de concentrations individuels. La cyclosporine étant un médicament avec un index thérapeutique étroit, la connaissance des interactions possibles entre ce médicament et d'autres substances, médicinales ou alimentaires, est cruciale. Nous avons donc choisi de faire une étude portant sur l'interaction entre la cyclosporine et les jus de pomelo et de canneberge afin de rendre l'étude plus intéressante d'un point de vue clinique.

Aucune étude clinique n'avait jamais été faite auparavant portant sur le pomelo et les canneberges. Nous avons choisi le pomelo car ce fruit est un proche parent du pamplemousse pour lequel l'interaction avec la cyclosporine est bien connue. Tout comme le pamplemousse, le pomelo augmente les concentrations de cyclosporine lorsqu'il est administré avec celle-ci. Bien que l'effet soit atténué en comparaison du pamplemousse, il n'en demeure pas moins que l'effet est cliniquement significatif suivant la prise d'un seul verre de jus de pomelo et suivant une dose unique de cyclosporine. Nos données semblent également suggérer que l'augmentation des concentrations de cyclosporine due au pomelo soit le résultat d'une inhibition du métabolisme et du transport au niveau de l'intestin plutôt qu'au niveau du foie. La popularité du pomelo est certes moins importante que celle du pamplemousse mais il n'en demeure pas moins important d'en étudier les propriétés. Certains patients avertis par leur médecin ou leur pharmacien de ne pas consommer de jus de pamplemousse à cause des interactions avec leurs médicaments, pourraient être tentés de remplacer le pamplemousse par le pomelo. Il y a aussi le fait que les médecines alternatives font parties de la réalité médicale. Dans la pharmacopée chinoise, le pomelo est utilisé comme antitussif.

Nous avons également choisi les canneberges pour l'intérêt grandissant envers celles-ci. On leur prête en effet des propriétés antioxydantes et un effet thérapeutique sur les infections urinaires. Par contre, pour ce qui est du jus de canneberge, son administration avec la cyclosporine ne produit aucun effet significatif sur les concentrations de cyclosporine. Il est intéressant de constater que malgré le fait que quelques flavonoïdes présents en grande quantité dans les canneberges présentent une certaine activité *in vitro* en tant qu'inhibiteur de la P-gp, cela ne résulte pas en un effet détectable *in vivo*. Le pamplemousse et le pomelo contiennent également des flavonoïdes en quantité appréciable mais c'est à une autre famille de composés, les furanocoumarins, qu'on attribue l'activité inhibitrice de ces agrumes. D'après nos résultats, les patients sous thérapie de cyclosporine peuvent consommer un verre de jus de canneberge sans danger.

Fait intéressant, un autre article portant sur les interactions possibles avec le jus de canneberge a été publié dans le même journal où paraissait notre article (chapitre 5), seulement

deux mois avant. Dans cet article, on y étudiait le flurbiprofen, un substrat de CYP2C9. Bien que le jus de canneberge inhibait significativement le CYP2C9 *in vitro* dans des microsomes hépatiques humains, aucun effet n'a été observé *in vivo* [1]. Par la suite, une autre équipe de chercheurs a étudié l'effet du jus de canneberge sur la pharmacocinétique de doses simples de warfarine, tizanidine et midazolam mais suite à l'administration répétée de jus de canneberge trois fois par jour pendant dix jours. Aucun effet significatif sur la pharmacocinétique de ces médicaments n'a été observé dans cette étude non plus. La S-warfarine a été utilisée comme sonde pour le métabolisme par le CYP2C9, la R-warfarine pour le CYP1A2 et CYP3A4, la tizanidine pour le CYP1A2 et le midazolam pour le CYP3A4 [2]. Enfin très récemment, un autre article est paru portant sur l'interaction possible du jus de canneberge avec les CYP3A entériques. Les chercheurs ont sélectionné parmi cinq jus de canneberge différents celui dont le potentiel inhibiteur était le plus grand pour l'hydroxylation du midazolam par le CYP3A dans des microsomes intestinaux. La marque de jus ainsi sélectionnée a été utilisée pour une étude *in vivo* chez 16 volontaires sains à qui on a administré du midazolam après avoir bu trois verres de jus de canneberge double-force (i.e. reconstitué avec la moitié de l'eau normalement utilisée) à l'intérieur de 30 minutes. L'absorption du midazolam était retardée et la biodisponibilité augmentée par rapport au midazolam administré avec de l'eau. Les auteurs affirment que des études *in vitro* devraient toujours appuyer des études *in vivo* d'interaction avec des produits naturels. Des études *in vitro* sont certes un incontournable lorsqu'il s'agit d'étudier les mécanismes sous-jacents à des interactions. Toutefois, elles ne sont pas un préalable nécessaire à une étude *in vivo* car une interaction pourrait avoir lieu à un autre niveau que celui des systèmes testés *in vitro*. Les études *in vivo* et *in vitro* dans le cadre des interactions médicamenteuses sont complémentaires. On pourrait questionner leur utilisation de 3 verres de jus double-force chez les volontaires, cela ne représentant pas une consommation normale de jus. Le fait que les résultats des études *in vitro* et *in vivo* sur le jus de canneberge se contredisent parfois, ne vient que renforcer la nécessité de les réaliser afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur la problématique. Observer qu'il n'y a pas d'interaction et tout aussi informatif que d'en observer une.

7.2 Allométrie vs modélisation PBPK et modèle d'absorption PBPK

Nous avons évalué le bien-fondé de construire un modèle pharmacocinétique physiologique dans le cadre du développement d'un médicament, ce type de modèle pouvant être utilisé dans le processus de passage entre les étapes pré-clinique et clinique. Bien que ce genre de modèle soit relativement complexe à élaborer, il offre l'avantage théorique d'intégrer autant des données *in vitro* que *in vivo* chez l'animal. Nous avons comparé ce type de modélisation à l'allométrie, une méthode dont l'utilisation est plus répandue. La cyclosporine a servi de médicament modèle.

Nous avons choisi de comparer l'allométrie à la modélisation PBPK pour la cyclosporine car ce médicament étant un substrat des CYP3A et P-gp, il est un archétype des médicaments problématiques dans le domaine de la prédiction et qu'il y a abondance de littérature sur la cyclosporine. C'est dans le cadre de notre étude comparative que nous avons construit un modèle d'absorption intestinale pour la cyclosporine. Comme nous l'avons déjà mentionné au chapitre 2 (section 2.2.4, p.40), quelques études ont établi la performance relative de différentes techniques d'extrapolation à partir de données *in vitro* ou animales pour des paramètres spécifiques comme la clairance hépatique, le volume de distribution ou la biodisponibilité. Cependant, on trouve seulement deux publications portant sur les performances relatives de l'allométrie par rapport à la modélisation PBPK en ce qui a trait à la prédiction de la pharmacocinétique globale chez l'humain, dont une seule considérait une administration orale [3]. Cette équipe de chercheurs de chez Hoffmann-La Roche avait la chance d'avoir à leur disposition des données sur 19 composés et ont pu faire une comparaison plus exhaustive entre l'allométrie et la modélisation PBPK dans la prédiction des paramètres pharmacocinétiques chez l'humain. Pour l'absorption, ils ont toutefois utilisé le programme GastroPlus™ qui ne peut pas faire de prédiction par rapport aux phénomènes de transport. Alors bien que notre comparaison ne considère qu'un seul médicament, notre modèle d'absorption intestinale a le mérite d'inclure le transport par la P-gp. De plus, afin d'inclure ce dernier, nous avons proposé une nouvelle façon simple d'analyser les données d'études de

perméabilité à l'aide de cellules Caco-2 par une analyse compartimentale. Par cette analyse, nous avons décomposé le transport en trois composantes : diffusion passive du côté basal, diffusion passive du côté apical et transport actif du côté apical. Le transport ainsi défini permet de localiser le métabolisme par les CYP3A à l'intérieur même des entérocytes.

La prédiction de la biodisponibilité chez l'humain suite à l'administration orale d'un médicament est très difficile. L'allométrie est en générale inapte à prédire ce paramètre mais les modèles physiologiques sont complexes à établir. Comme nous en avons déjà discuté aux chapitres 2 et 5, un tel modèle est nécessairement limité par le type de données disponibles dans la littérature. Ensuite, bien que d'un point de vue mathématique on puisse décrire bien des processus physiologiques, il n'en demeure pas moins que certains concepts demeurent théoriques faute de pouvoir en estimer les paramètres. Nous sommes quand même parvenus à construire un tel modèle qui nous a donné une prédiction acceptable de F . Cette prédiction est toutefois probablement surestimée du fait que nous avons considéré que toute la dose était disponible pour l'absorption ($F_a=1$). Avec la formulation de Néora®, il s'agit d'une approximation acceptable si on fait l'hypothèse raisonnable que le métabolisme et le transport au niveau intestinal sont les facteurs déterminants de la biodisponibilité de la cyclosporine. Il n'en va pas de même pour tous les médicaments. L'inclusion de paramètres de dissolution dans ce modèle d'absorption serait une autre avenue à explorer dans le futur.

Nous avons vu que notre modèle d'absorption est très sensible aux valeurs de plusieurs paramètres mais leur estimation est parfois assez difficile. C'est dans un tel contexte toutefois que certains principes de l'analyse de population pourraient contribuer à l'amélioration des modèles PBPK. Nous avons donné un exemple dans le chapitre 5 avec le transit intestinal. Il est un peu futile d'essayer d'assigner une valeur unique à chacun des paramètres sachant qu'il y a une variabilité naturelle inhérente à tout processus physiologique. En intégrant des termes de variabilité c'est un peu comme passer d'un profil de concentrations moyennes à des profils individuels. La variabilité entre les individus est un des aspects que l'allométrie ne peut pas prendre en considération mais qui peut très bien s'intégrer dans la modélisation PBPK. Pour l'instant la réalité ne dépasse pas la fiction et il est encore difficile d'extraire des termes de

variabilité de la littérature, souvent à cause de la façon dont les résultats sont présentés. En effet un auteur qui publie sur l'expression d'un enzyme dans l'intestin n'a pas nécessairement en tête la construction d'un modèle PBPK. Il y a encore beaucoup à faire pour colliger toutes les données disponibles et tenter de les utiliser à cette fin mais le travail est déjà bien entamé avec l'élaboration de logiciels comme GastroPlus™ pour l'absorption et Simcyp Clearance and Interaction Simulator® pour le métabolisme hépatique.

L'allométrie rend bien compte de processus tel que l'élimination par voie rénale. Par contre, lorsqu'un médicament est métabolisé de façon significative, cette technique est moins appropriée étant donné les grandes différences d'une espèce à l'autre. Il en va de même pour les phénomènes de transport actif. Nous avons démontré au chapitre 5 que la prédiction de la CL_s pour la cyclosporine était grandement surestimée par l'allométrie classique mais la règle des exposants améliore la prédiction. Dans le cas particulier de la cyclosporine, on trouve dans la littérature plusieurs valeurs de CL_s prédites par différentes techniques. C'est une méthode d'extrapolation *in vitro-in vivo* qui tient compte de la variabilité dans la distribution des enzymes CYP qui a donné la meilleure prédiction par rapport aux valeurs observées à la fois dans notre étude et celles retrouvées dans la littérature. Dans le cas du volume total de distribution, l'allométrie surestime grandement les valeurs observées pour la cyclosporine et des approches plus physiologiques, ou mécanistiques, ont donné de meilleurs résultats. Le modèle physiologique à partir duquel nous avons bâti notre modèle global est celui menant à la meilleure prédiction du V_{ss} pour la cyclosporine. On ne peut pas généraliser pour tous les médicaments substrats des CYP3A et P-gp à partir du seul cas de la cyclosporine mais cet exemple démontre qu'il est quand même possible d'avoir de meilleures prédictions de la pharmacocinétique chez l'humain que celles obtenues par allométrie. De plus, la modélisation physiologique a permis de prédire la biodisponibilité de la cyclosporine, prédiction qui ne peut être faite par l'allométrie.

7.3 Analyses compartimentales individuelle et de population

La modélisation pharmacocinétique compartimentale est un problème mathématique complexe, surtout lorsqu'il s'agit d'analyses de population. Ce type d'analyse est de plus en plus utilisé dans le cadre du développement d'un médicament. Il est cependant important de connaître quelles sont les hypothèses et les limitations des outils utilisés. Notre deuxième étude comparative portait donc sur des méthodes d'analyse compartimentale de population. Il existe des études plus exhaustives quand au nombre de méthodologies étudiées mais notre étude était la première à considérer un aussi grand nombre de modèles structuraux sur lesquels comparer la performance des méthodes.

Nous avons comparé des méthodes ayant en commun d'être des méthodes paramétriques utilisant le maximum de vraisemblance comme estimateur, en utilisant une série de 46 études simulées. En utilisant des données simulées, on peut ainsi connaître les vraies valeurs des paramètres individuels et de population et ainsi les comparer aux estimés des différentes méthodes. Toutes les méthodes donnaient en général de bons estimés de la moyenne de population des paramètres pharmacocinétiques mais de moins bons estimés pour les termes de variabilité. Cependant, les méthodes de population avec effets combinés (IT2S®, NONMEM®, Kinetica™) étaient en général supérieures aux méthodes individuelles (STS et GTS), autant pour les moyennes de population que pour les estimés individuels des paramètres PK et les paramètres de variabilité, intra- et inter-individu, ce qui est en accord avec la littérature. De plus, avec les modèles structuraux que nous avons inclus dans notre étude, NONMEM® apparaît de façon générale comme la méthode de choix. Cependant, en regardant plus attentivement les estimés individuels, nous nous sommes aperçus que chacune des méthodes donnait les meilleurs estimés pour au moins une étude.

Tel qu'on pouvait s'y attendre d'après ce qui est connu dans la littérature, nous avons aussi constaté que le type d'échantillonnage, i.e. riche ou épars, influençait grandement la précision des estimés. Ceci était d'autant plus vrai pour les méthodes individuelles. Ce à quoi nous nous attendions moins par contre est que dans le cas de IT2S®, la présence d'une procédure MAP-Bayésienne n'est pas suffisante pour bien estimer les paramètres PK lorsque l'échantillonnage

est pauvre. Dans le même ordre d'idée, nous avons été surpris aussi de constater que pour les méthodes avec effets combinés, le nombre d'individus dans une étude n'était pas des plus déterminant dans la qualité de la modélisation en comparaison avec d'autres facteurs, même pour un échantillonnage pauvre. En effet, une augmentation du nombre d'individus ne semblait pas compenser pour l'échantillonnage pauvre de chaque individu, et ce même si l'échantillonnage couvrait toutes les phases des profils pharmacocinétiques. Cette observation semble à première vue aller à l'encontre des idées reçues sur les principes de taille d'échantillon. En fouillant dans la littérature par contre on se rend compte qu'en faisant une approximation de l'intégrale de la vraisemblance jointe plutôt que de la calculer de façon exacte, on perd la propriété mathématique de consistance de l'estimateur du maximum de vraisemblance. Propriété qui est conservée avec les méthodes non paramétriques et qui leur confère un certain avantage.

Une des observations qui par le passé à amener à cette étude comparative, était le fait que certains modèles complexes avaient pu être modélisés avec IT2S® là où NONMEM® avait échoué. Au cours de cette étude nous avons également comparé de façon plus approfondie NONMEM® et IT2S® et avons observé une tendance qui va dans le même sens. La supériorité de NONMEM® quant à la précision des estimés individuels était claire pour des modèles à un et deux compartiments mais disparaissait au profit de IT2S® pour des modèles à trois compartiments. Cette observation amène à d'autres avenues qu'il serait intéressant d'investiguer dans le futur. Les méthodes pour d'autres types de modèles structuraux plus complexes tels des modèles PK/PD ou encore des modèles incluant la formation de métabolites. Une autre piste qui pourrait être intéressante pour le cas de IT2S® serait de tester si le fait de recalculer la variabilité résiduelle plus fréquemment augmente la qualité des estimés de la variabilité inter et intra-individuelle. Si on se penche sur la distribution statistique des paramètres pharmacocinétiques, on pense bien sûr aux méthodes d'analyse non paramétrique qui ne présupposent pas de distribution. Ces méthodes ont été comparées aux méthodes paramétriques mais encore une fois sur un nombre limité de modèles. Il serait très intéressant de faire la comparaison avec le même type d'étude que celle que nous avons réalisée.

Maintenant que nous avons fait une première exploration, il serait aussi intéressant aussi de procéder de façon plus systématique dans le choix des modèles simulés pour étudier quelques variables de façon plus ciblée. Par exemple, si on prend le cas de l'effet de la complexité du modèle structural sur la précision des estimés, on pourrait simuler des études pour lesquelles la variabilité résiduelle et la variabilité inter individuelle ne varient pas, avec un nombre d'individus fixe mais pour lesquels seul le modèle structural change d'une étude à l'autre. Comme modèle plus complexe on pense à des modèles PK-PD, des modèles incluant des métabolites ou encore des modèles avec des covariables pour les méthodes qui peuvent les accommoder.

7.4 Conclusion

Nous avons fait un modèle PBPK pour un seul médicament, la cyclosporine, modèle qui s'est avéré plus performant que l'allométrie dans la prédiction de la pharmacocinétique. Le modèle PBPK a par contre le désavantage d'être beaucoup plus long et complexe à élaborer. En analysant de façon différente les résultats d'expérience de perméabilité avec des cellules Caco-2, nous avons pu ajouter au métabolisme intestinal le transport par les P-gp intestinales dans notre modèle d'absorption PBPK. L'allométrie demeure beaucoup plus simple conceptuellement mais nécessite une plus grande utilisation d'animaux. Il faudrait bien sûr évaluer la performance de notre modèle PBPK sur un plus grand nombre de molécules avant de généraliser sur son plein potentiel. La satisfaction que l'on peut avoir d'un modèle PBPK va dépendre du degré de précision visé. Malgré le fait que les modèles PBPK existent depuis un certains temps, il reste encore beaucoup d'exploration à faire avant de pouvoir les utiliser de façon courante dans le processus de développement d'un médicament. Les modèles ne peuvent pas aller au-delà des connaissances que nous avons des processus physiologiques et des propriétés physico-chimiques d'une molécule. Ils pourront cependant se raffiner au fur et à mesure que les connaissances s'accumulent sur les enzymes de métabolisme et de transport, leur activité, leur distribution dans les organes et dans la population en général, les génotypes et phénotypes existants, les mécanismes de régulation (inhibition et induction) ainsi que l'évolution des modèles *in vitro* pouvant représenter ces différents systèmes. La modélisation PBPK

pourrait éventuellement permettre aussi de prédire la pharmacocinétique dans des populations vulnérables comme les enfants par exemple.

Les méthodes d'analyse de population donnent de meilleurs estimés que les méthodes individuelles mais ne s'équivalent pas pour autant entre elles. Il existe de multiples méthodes de population et elles ne sont pas simples à apprivoiser. Comme aucune méthode n'est optimale dans toutes les situations, il est donc bon d'en connaître plus d'une. Il faut par contre savoir dans quels contextes les utiliser et notre étude comparative est utile en ce sens. Notre étude était la première à comparer différentes méthodologies pour autant de modèles structuraux différents. D'autres études semblables à celle que nous avons faite seraient utiles pour comparer d'autres modèles structuraux et d'autres méthodologies. Ceci est d'autant plus vrai que l'analyse de population est de plus en plus utilisée. Dans le cadre du développement du médicament, les méthodes de population permettent d'utiliser les connaissances acquises au fur et à mesure dans les études antérieures pour mieux planifier les suivantes. Les méthodes de population permettent non seulement d'utiliser les estimés précédents des paramètres pharmacocinétiques mais aussi d'identifier s'il y a lieu des sous-populations par des analyses de covariables.

7.5 Références

1. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Perloff ES, Luo Y, Harmatz JS, Zinny MA. Interaction of flurbiprofen with cranberry juice, grape juice, tea, and fluconazole: in vitro and clinical studies. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79(1):125-33
2. Lilja JJ, Backman JT, Neuvonen PJ. Effects of daily ingestion of cranberry juice on the pharmacokinetics of warfarin, tizanidine, and midazolam--probes of CYP2C9, CYP1A2, and CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(6):833-9
3. Jones HM, Parrott N, Jorga K, Lave T. A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(5):511-42

ANNEXE I

Autorisation de rédiger par articles